

Isabel Mendiara Negredo

Desarrollo de métodos analíticos para el análisis de precursores de colesterol, fitoesteroles e hidroxiesteroles de interés biológico en el estudio del metabolismo del colesterol

Departamento
Química Analítica

Director/es
Nerín de la Puerta, Cristina
Domeño Recalde, Celia

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**DESARROLLO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA EL ANÁLISIS DE
PRECURSORES DE COLESTEROL,
FITOESTEROLES E
HIDROXIESTEROLES DE INTERÉS
BIOLÓGICO EN EL ESTUDIO DEL
METABOLISMO DEL COLESTEROL**

Autor

Isabel Mendiara Negredo

Director/es

Nerín de la Puerta, Cristina

Domeño Recalde, Celia

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Química Analítica

2014



**Universidad
Zaragoza**

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento de Química Analítica

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
EL ANÁLISIS DE PRECURSORES DE
COLESTEROL, FITOESTEROLES E
HIDROXIESTEROLES DE INTERÉS BIOLÓGICO
EN EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL
COLESTEROL**

ISABEL MENDIARA NEGREDO

TESIS DOCTORAL

2014



**Universidad
Zaragoza**

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento de Química Analítica

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
PARA EL ANÁLISIS DE PRECURSORES DE
COLESTEROL, FITOESTEROLES E
HIDROXIESTEROLES DE INTERÉS BIOLÓGICO
EN EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL
COLESTEROL**

Memoria presentada por

Dña. ISABEL MENDIARA NEGREDO

para optar al grado de doctor

Dirigida por

Dra. D^a CELIA DOMEÑO RECALDE

Dra. D^a CRISTINA NERÍN DE LA PUERTA

- Octubre de 2014 -



Escuela de
Ingeniería y Arquitectura
Universidad Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación
en Ingeniería de Aragón
Universidad Zaragoza

L

La **Dra. Celia Domeño Recalde**, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza y la **Dra. Cristina Nerín de la Puerta**, Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada: “DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL ANÁLISIS DE PRECURSORES DE COLESTEROL, FITOESTEROLES E HIDROXIESTEROLES DE INTERÉS BIOLÓGICO EN EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL” presentada por **Dña. Isabel Mendiara Negredo** para optar al grado de Doctor en Ciencia Analítica en Química, ha sido realizada bajo nuestra codirección en el Escuela de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad de Zaragoza, de acuerdo a los objetivos presentados en el Proyecto de Tesis aprobado por el Departamento de Química Analítica. Por tanto, autorizamos su presentación para proseguir con los trámites oportunos y proceder a su calificación por el tribunal correspondiente.

En Zaragoza, a 14 de Octubre de 2014.

Fdo. Celia Domeño Recalde

Fdo. Cristina Nerín de la Puerta

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de Aragón a través del proyecto PM037/2009 *“Estudio de esteroides, ácidos biliares y diferentes adipocinas como marcadores en el diagnóstico y tratamiento de las Hipercolesterolemias Hereditarias”* y por el Fondo Social Europeo a través del Grupo Consolidado de Investigación T-10, Grupo GUIA-Universidad de Zaragoza.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza bajo la dirección de las profesoras Celia Domeño y Cristina Nerín a las que quiero agradecer el apoyo y la dedicación.

Extiendo mi agradecimiento a los compañeros del Departamento de Química Analítica y del Grupo GUIA que prestaron su ayuda.

Deseo agradecer de manera especial al Dr. Jesús de la Osada García y al Dr. Roberto Martínez Beamonte del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza el interés, entusiasmo y consejo aportados.

También agradezco la colaboración prestada al Dr. Miguel Pocoví Mieras y al Dr. Fernando Civeira Murillo de la Unidad de Lípidos del Hospital Miguel Servet de Zaragoza.

ÍNDICE GENERAL

GLOSARIO DE TÉRMINOS	I
PRESENTACIÓN	1
SECCIÓN I: INTRODUCCIÓN.....	8
1.-EL COLESTEROL EN EL ORGANISMO	9
2.-LOS ESTEROLES Y EL METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	13
3.-TRATAMIENTO DE MUESTRA EN EL ANÁLISIS DE ESTEROLES	26
4.-ANÁLISIS INSTRUMENTAL.....	44
5.-APLICACIONES.....	52
SECCIÓN II: OBJETIVOS.....	57
SECCIÓN III: EXPERIMENTAL	59
CAPÍTULO 1: DETERMINACIÓN DE PRECURSORES DE COLESTEROL, FITOESTEROLES E HIDROXIESTEROLES EN SUERO HUMANO	60
1.- INTRODUCCIÓN	60
2.- OBJETIVOS	62
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	63
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
5.- CONCLUSIONES	88
CAPÍTULO 2: DESARROLLO DE UN MÉTODO ONLINE RAM-LC-MS PARA LA DETERMINACIÓN DE PRECURSORES DE COLESTEROL Y FITOESTEROLES EN SUERO HUMANO.....	89
1.- INTRODUCCIÓN	89
2.- OBJETIVOS	93
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	94
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	108
5.- CONCLUSIONES	126

CAPÍTULO 3: DETERMINACIÓN DE HIDROXIESTEROLES EN HÍGADO DE RATA	127
1.- INTRODUCCIÓN	127
2.- OBJETIVOS.....	130
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	131
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	141
5.- CONCLUSIONES	182
 CAPÍTULO 4: DETERMINACIÓN DE HIDROXIESTEROLES EN PLASMA DE RATA Y SU CORRELACIÓN CON SUS NIVELES HEPÁTICOS	183
1.- INTRODUCCIÓN	183
2.- OBJETIVOS.....	186
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	187
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	196
5.- CONCLUSIONES	220
 CAPÍTULO 5: HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE HIDROXIESTEROLES ESTERIFICADOS EN PLASMA DE RATA	221
1.- INTRODUCCIÓN	221
2.- OBJETIVOS.....	224
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	225
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	234
5.- CONCLUSIONES	248
 CAPÍTULO 6: BÚSQUEDA DE COMPUESTOS MARCADORES DE LA MUTACIÓN DEL GEN CYP7B1 EN HÍGADO DE RATA	249
1.- INTRODUCCIÓN	249
2.- OBJETIVOS.....	254
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	255
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	259
5.- CONCLUSIONES	280

SECCIÓN IV: CONCLUSIONES	282
SECCIÓN V: BIBLIOGRAFÍA.....	286
SECCIÓN VI: PUBLICACIONES	304

GLOSARIO DE TÉRMINOS

24-OH	24-hidroxicolesterol
25-OH	25-hidroxicolesterol
27-OH	27-hidroxicolesterol
AGP	α -glicoproteína
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photo Ionization</i>
BHT	Butilhidroxitolueno
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CHOL	Colesterol
CLT	Colestanol
CMP	Campesterol
<i>Cyp7b1</i>	<i>Cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1</i>
DSM	Desmosterol
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EI	<i>Electron impact</i>
ELSD	<i>Evaporating Light Scattering Detector</i>
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i>
ESCI	<i>Multi-Mode Ionization Source</i>

GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC/MS	<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i>
GUIA	Grupo Universitario de Investigación Analítica
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HLB	<i>Hydrophilic lipophilic balance</i>
HMDB	<i>Human Metabolome Data Base</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDL	<i>Intermediate Density Lipoproteins</i>
IS	<i>Internal Standard</i>
ISRP	<i>Internal Surface Reversed-Phase</i>
KO	<i>Knock Out</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LAN	Lanosterol
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
M	ion característico
MS ^E	<i>Mass Spectrometry high and low energy acquisition mode</i>

MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MTBE	Metil tert-butil eter
OPLS	<i>Ortogonal Projections to Latent Structures</i>
OPLS-DA	<i>(Ortogonal Projections to Latent Structures-Discriminant Analysis)</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Q	<i>Quadrupole</i>
QM	Quilomicrón
QTOF	<i>Quadrupole Time of Flight</i>
R^2	<i>Regression coefficient</i>
RAM	<i>Restricted Access Material</i>
RT	<i>Retention Time</i>
RSD	<i>Relative Standard deviation</i>
SIR	<i>Single Ion Recording</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
STA	Sitostanol
STE	Sitosterol
STG	Estigmasterol
TG	Triglicéridos
TMS	Trimetilsilil

<i>TQD</i>	<i>Triple Quadrupole Detector</i>
UA	Unidades de Absorbancia
<i>UHPLC</i>	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>UPLC™</i>	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
<i>VLDL</i>	<i>Very Low-Density Lipoprotein</i>
WT	<i>Wild Type</i>

PRESENTACIÓN

El presente trabajo titulado **“Desarrollo de métodos analíticos para el análisis de precursores de colesterol, fitoesteroles e hidroxiesteroles de interés biológico en el estudio del metabolismo del colesterol”** El trabajo se enmarca en el campo de investigación de metodologías analíticas para la determinación de compuestos en matrices biológicas, que se lleva a cabo en el Grupo Universitario de Investigación Analítica (GUIA), del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza. El grupo está integrado en el Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A).

Esta línea de investigación se incorporó de forma más intensa al grupo a partir de los proyectos de investigación PM96/2006 *“Desarrollo de una nueva metodología analítica para el estudio de las Hipercolesterolemias Hereditarias mediante la determinación de esteroides por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia/UPLC”* y PM037/2009 *“Estudio de esteroides, ácidos biliares y diferentes adipocinas como marcadores en el diagnóstico y tratamiento de las Hipercolesterolemias*

Hereditarias". Ambos fueron financiados por la Dirección General de Investigación, Innovación y Desarrollo del Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón.

En el marco de esta línea de investigación se han realizado diversos trabajos en forma de proyectos fin de carrera, tesis doctorales y artículos científicos.

Durante el desarrollo del trabajo se ha contado con la colaboración de la Unidad de Lípidos del Hospital Miguel Servet de Zaragoza, y el Grupo de Bases Moleculares de la Aterosclerosis del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Zaragoza.

Esta tesis doctoral se centra en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de esteroides en diferentes matrices biológicas como el hígado, el suero y el plasma, utilizando para su determinación la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.

Los esteroides son marcadores del metabolismo del colesterol porque participan en procesos como la síntesis (precursores de colesterol), la absorción a nivel intestinal de colesterol procedente de la dieta (fitoesteroides) y la degradación mediante procesos oxidativos para dar ácidos biliares (hidroxiesteroides). La medida de los niveles de estos analitos proporciona información sobre el estado del metabolismo del colesterol y permite el estudio de las patologías asociadas a un mal funcionamiento del mismo.

Durante el desarrollo de los métodos analíticos se ha prestado especial atención al tratamiento de muestra procurando optimizar las etapas para conseguir protocolos más sencillos, rápidos y automatizados para aumentar el número de muestras que pueden ser procesadas en una jornada. Los métodos desarrollados han permitido obtener nueva información en la línea de investigación seguida en este trabajo.

La memoria se ha estructurado en varias secciones:

La sección I plantea una introducción general del tema en el que se ha desarrollado la tesis.

La sección II presenta los objetivos planteados para el desarrollo de este trabajo.

La sección III muestra el desarrollo experimental, dividido en seis capítulos que se exponen a continuación. Todos los capítulos son autocontenidos. Cada uno de ellos se ha desarrollado dividiéndolo en cinco apartados. Se comienza con una introducción al trabajo de ese capítulo posteriormente, se describen los objetivos, los materiales y métodos utilizados y finalmente se detallan los resultados y conclusiones.

- Capítulo 1: Se llevó a cabo la determinación de precursores de colesterol, fitoesteros e hidroxiesteros en suero humano. En este capítulo se redujo el tiempo de tratamiento de muestra mediante una optimización de la reacción de hidrólisis alcalina asistida por ultrasonidos.

- Capítulo 2: Se desarrolló un método online RAM-LC-MS para la determinación de precursores de colesterol y fitoesteroles en suero humano. En este capítulo se pretendió automatizar parte de tratamiento de muestra realizando el proceso de limpieza de la muestra, cromatografía y detección en el mismo sistema.
- Capítulo 3: Se desarrolló un método analítico para la determinación de hidroxisteroles en hígado de rata. Posteriormente, se determinaron los niveles de estos analitos en diferentes modelos animales: sanos, enfermos y enfermos con tratamiento. Además, el estudio se realizó en dos condiciones fisiológicas: ayuno y postprandial.
- Capítulo 4: Adaptando el método desarrollado en el capítulo anterior, se determinaron los niveles de hidroxisteroles en muestras de plasma de rata. Posteriormente se calculó el grado de correlación entre los valores obtenidos para ambas matrices con la finalidad de evitar una biopsia hepática en estudios posteriores.
- Capítulo 5: Se desarrolló un método de hidrólisis enzimática para hidroxisteroles esterificados en el plasma de rata. Con este método se pretendió eliminar los problemas de interferencias y pérdida de muestra que ocasiona la hidrólisis alcalina y reducir el tiempo de esta etapa. Todo ello gracias a la selectividad proporcionada por las enzimas.

- Capítulo 6: Se buscaron nuevos marcadores de la mutación del gen *Cyp7b1* en hígado de rata, haciendo uso de un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de espectrometría de masas con analizador tiempo de vuelo. Con este equipo y un software especializado se encontraron nuevos marcadores candidatos de la mutación.

En las secciones IV, V y VI se muestra un resumen de las conclusiones más relevantes, las referencias bibliográficas y las publicaciones que derivan de este trabajo.

La visión general del presente trabajo se muestra en el siguiente diagrama de bloques.

SECCIÓN I: INTRODUCCIÓN

SECCIÓN II: OBJETIVOS

SECCIÓN III: EXPERIMENTAL

Capítulo 1: Determinación de, precursores de colesterol, fitoesteroles e hidroxiesteroles en suero humano.

Capítulo 2: Desarrollo de un método online RAM-LC-MS para la determinación de precursores de colesterol y fitoesteroles en suero humano.

Capítulo 3: Determinación de hidroxiesteroles en hígado de rata.

Capítulo 4: Determinación de hidroxiesteroles en plasma de rata y su correlación con los niveles hepáticos.

Capítulo 5: Hidrólisis enzimática de hidroxiesteroles esterificados en plasma de rata.

Capítulo 6: Búsqueda de compuestos marcadores de la mutación del gen CYP7B1 en hígado de rata.

SECCIÓN IV: CONCLUSIONES

SECCIÓN V: BIBLIOGRAFÍA

SECCIÓN VI: PUBLICACIONES

SECCIÓN I:
INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Para conocer el marco de la investigación desarrollada es necesario explicar cómo los compuestos estudiados están relacionados con el metabolismo del colesterol. En primer lugar, se comienza explicando qué son los esteroides y su participación en las etapas fundamentales de ese metabolismo: síntesis, absorción y degradación. Se explicará la función del hígado y la sangre como órganos responsables del mantenimiento de la homeostasis del proceso y del transporte de los compuestos hacia otras partes del organismo. Posteriormente, se abordará el problema de la determinación analítica de estos compuestos realizando una revisión de los métodos más utilizados. Finalmente, se expone el estado en el que se encuentra la investigación y su aplicación al estudio de casos concretos de alteraciones del metabolismo del colesterol.

1.-EL COLESTEROL EN EL ORGANISMO

1.1-ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS

El colesterol es el esteroide más abundante y a su vez el más estudiado. Fue descubierto en 1770 por el francés Poulletiere de la Salle, quien lo aisló de los cálculos biliares, por lo que en un principio se denominó colestiramina (grasa biliar), y luego pasó a llamarse colestina (chole=bilis y stereos=sólido). Finalmente, se denominó colesterol cuando se comprobó la presencia de un grupo hidroxilo en su molécula. En 1843, Vogel detectó la presencia de colesterol en placas ateromatosas. Desde entonces, los análisis clínicos y las observaciones histológicas establecieron que la aterosclerosis y sus complicaciones cardíacas están ligadas al metabolismo anormal de los lípidos, asociándose el colesterol con enfermedades cardiovasculares (Molina y cols.,1991).

Su estructura fue determinada con bastante precisión en 1930. Consiste en un anillo de ciclopentano-perhidrofenantreno y se caracteriza por presentar un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo, un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 y una cadena lateral de 8 átomos de carbono anclada en el carbono 17 (Abidi,2004).

El esqueleto de una molécula de esteroide se muestra en la Figura 1

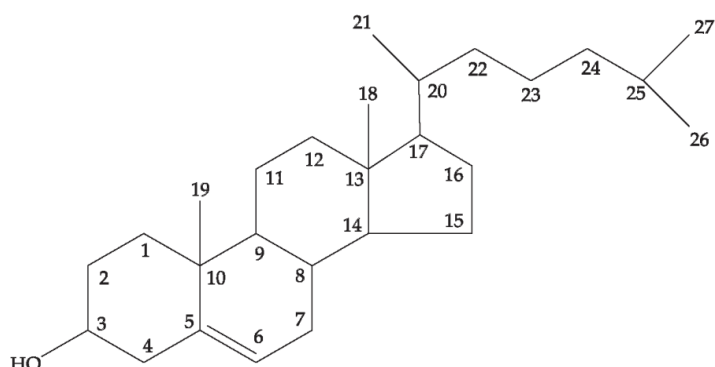


Figura 1. Estructura del esqueleto de los esteroides

La mayoría de propiedades químicas de los esteroides están relacionadas con la presencia del doble enlace y grupo alcohol secundario de la molécula. El doble enlace les confiere propiedades características de compuestos insaturados. Por otra parte, el grupo hidroxilo del carbono 3 forma fácilmente ésteres con ácidos grasos que se conocen con el nombre de ésteres de esteroide o esteroides esterificados. Como se explicará posteriormente, estos ésteres se encuentran ampliamente distribuidos en tejidos y sangre (Pocoví y cols.,2004).

Debido a la composición fundamentalmente hidrocarbonada de los esteroides, estos compuestos son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos apolares. También se disuelven bien en acetona, éter, benceno, cloroformo y algunos alcoholes como 2-propanol o metanol, mejor en caliente que en frío. Son inodoros e insípidos y son sólidos a temperatura ambiente y tienen puntos de fusión en torno a 150°C (Pocoví y cols.,2004).

El colesterol y los esteroides son malos conductores de la electricidad al tener una constante dieléctrica alta con lo cual son buenos aislantes eléctricos. Esta propiedad explicaría que sean componentes importantes en las

estructuras de recubrimiento como las membranas celulares (Pocoví y cols.,2004).

1.2-FUNCIONES BIOLÓGICAS

El colesterol es una molécula imprescindible para el organismo de humanos y animales con un importante número de funciones biológicas: es un componente esencial de las membranas celulares, donde tiene la función de modular su fluidez, su permeabilidad y en consecuencia su función. Sirve como precursor de otras biomoléculas importantes como son las hormonas esteroideas, la vitamina D y los ácidos biliares. También es necesario para la síntesis y secreción de las lipoproteínas. Además está implicado en la embriogénesis y en la diferenciación celular (Pocoví y cols.,2004).

Debido a todas estas funciones, los niveles de colesterol deben estar finamente regulados. Todo esto sucede a través un proceso denominado homeostasis del colesterol. La homeostasis se mantiene cuando existe un equilibrio entre la síntesis endógena del esteroide con su absorción intestinal y con la degradación del mismo (Ros,2006).

Hay muchos órganos implicados en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol pero hay que destacar el papel central del hígado. Un esquema se muestra en la Figura 2.

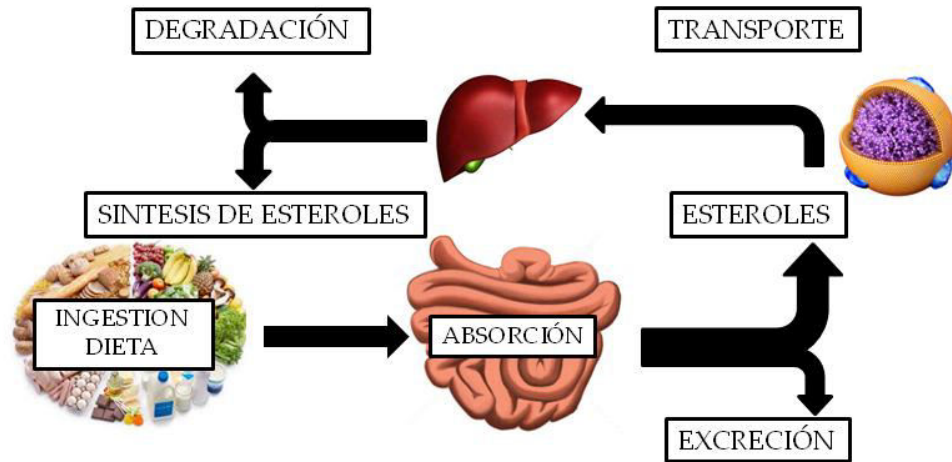


Figura 2. Esquema del proceso de homeostasis de los esteroides en el organismo

En situación de equilibrio homeostático, la cantidad de colesterol excretada diariamente en las heces, procede de la dieta, de la bilis y del metabolismo intestinal. Además está equilibrada con la suma del colesterol sintetizado por los tejidos y del aportado por las comidas.

El hígado regula al mismo tiempo la síntesis de los ácidos biliares que son productos del catabolismo del colesterol. El hígado también regula el balance de colesterol del organismo porque procesa las lipoproteínas que contienen el colesterol procedente de los tejidos y las procedentes de la absorción de colesterol a nivel intestinal. Este transporte de las lipoproteínas se realiza a través del torrente sanguíneo, cuya principal función es el transporte de metabolitos desde los órganos productores hasta los órganos donde son requeridos (Sanclemente y cols.,2009). Este proceso se explicará más detalladamente en el apartado 3.1.2 de esta introducción.

2.-LOS ESTEROLES Y EL METABOLISMO DEL COLESTEROL

Como se dijo anteriormente, los organismos vivos regulan la cantidad de colesterol de tres formas: controlando la síntesis, la absorción y la degradación. Los esteroides son compuestos que participan en las rutas implicadas en el metabolismo del colesterol y han demostrado ser marcadores de estos procesos, es decir, que la medida de la concentración de estos compuestos puede ser utilizada como método de evaluación indirecta del metabolismo del colesterol (Thompson,2004).

A lo largo de este trabajo se han determinado once esteroides, cada uno de ellos participaba en alguno de los tres procesos mencionados anteriormente, y que se explicarán con más detalle a continuación. Así, la concentración de determinados precursores del colesterol como desmosterol y lanosterol es un indicador de la generación del colesterol en el organismo. Además, el cuerpo absorbe el colesterol procedente de la dieta y puede ser estimado por medio de los niveles de esteroides vegetales o fitoesteroides como son el campesterol, estigmasterol sitosterol y el sitostanol (Miettinen y cols.,1990). La tasa de degradación de colesterol a nivel hepático es proporcionada por determinados metabolitos intermedios como los hidroxiesteroides (7α -hidroxi-4-colesten-3-ona, 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol) y a nivel cerebral, el 24-hidroxicolesterol (Russell y cols.,1992). La acumulación de otros esteroides como el colestanol se relaciona indirectamente con un exceso de colesterol en el organismo (Salen y cols.,1972).

Un esquema de los esteroides estudiados y utilizados como marcadores de cada una de las etapas del metabolismo del colesterol se muestra en la Figura 3.

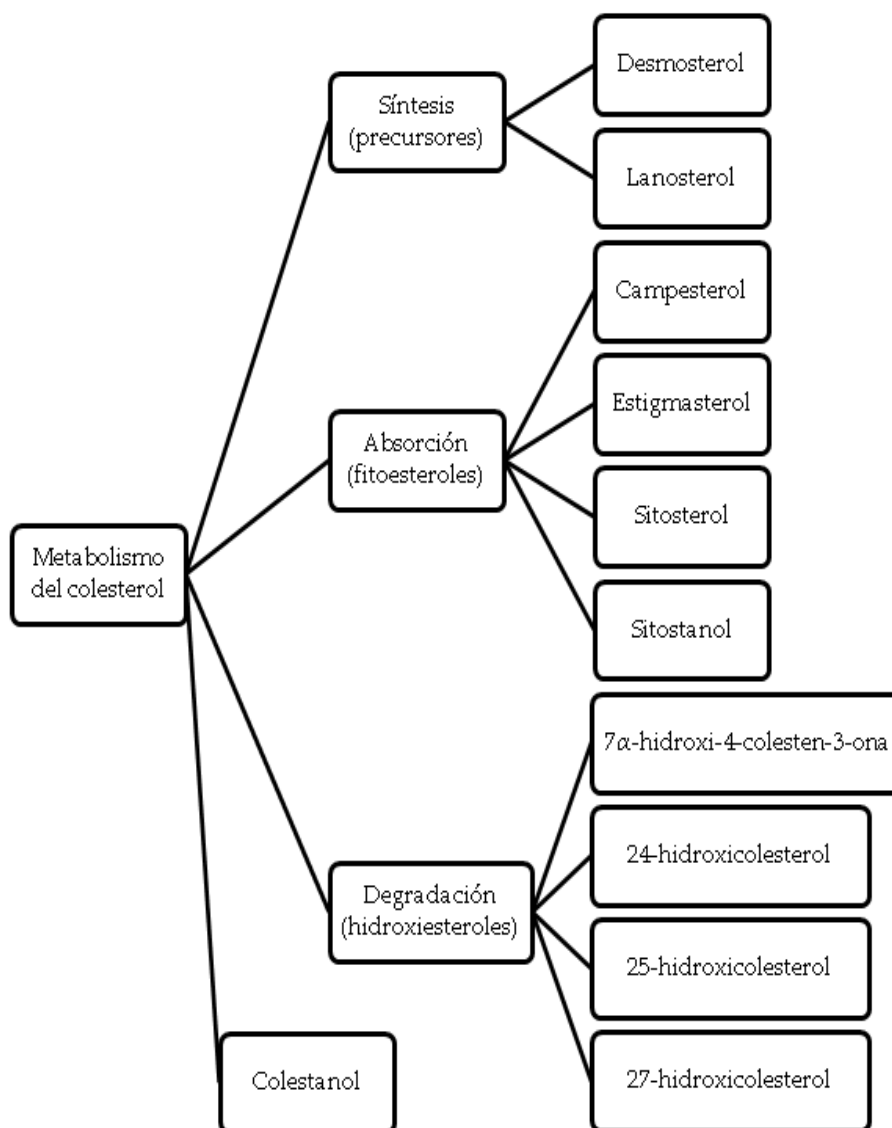


Figura 3. Esquema de los principales procesos del metabolismo del colesterol y los compuestos utilizados como marcadores de cada uno de ellos

2.1-PROCESO DE SÍNTESIS DE COLESTEROL

Todas las células del organismo tienen la capacidad de sintetizar colesterol. Aproximadamente, la síntesis en los tejidos extrahepáticos supone el 80% del total y el 20% restante del colesterol es sintetizado en el hígado. Sin embargo, la síntesis hepática tiene una gran relevancia en la homeostasis del colesterol (Sanclemente y cols.,2009).

Esta síntesis se produce a partir del acetil-CoA y está bajo control de la enzima hidroximetil-glutaril-CoA-reductasa (HMG-CoA reductasa) que a su vez, disminuye su actividad en presencia de colesterol, es decir, el colesterol actúa como inhibidor de la enzima cuando las necesidades están cubiertas.

A lo largo de la historia se han propuesto diversos precursores de colesterol como marcadores de la síntesis corporal de este compuesto. Este es el caso de los metil-esteroides libres como el lanosterol, estudiado en este trabajo. También se utilizan compuestos como el escualeno, el ácido mevalónico, el lanosterol y el desmosterol, este último también estudiado en este trabajo.

El fundamento para usar los niveles circulantes de estos compuestos como indicadores se basa en el hecho de que estos compuestos pasan a las lipoproteínas de la sangre a un ritmo proporcional a la de su formación en la ruta de síntesis (Kuksis,2001). Un esquema de esta ruta se muestra en la Figura 4.

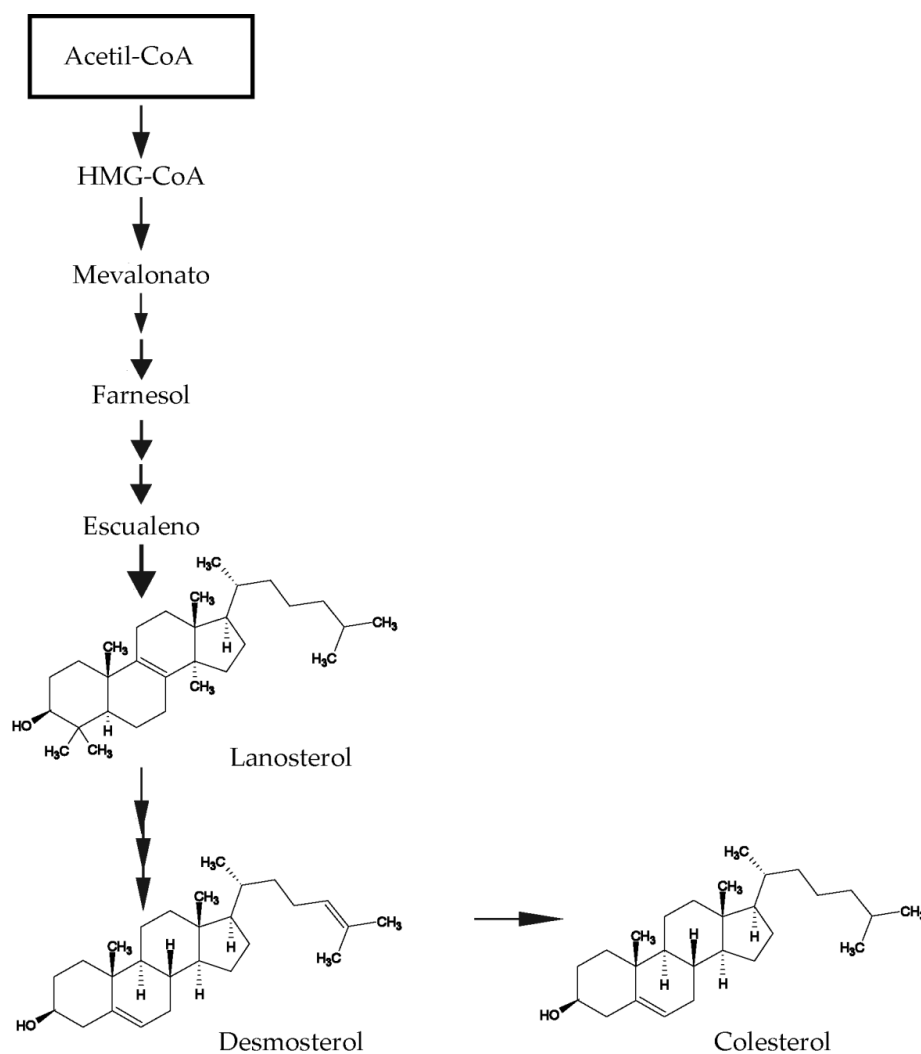


Figura 4. Ruta esquematizada de la síntesis del colesterol

Puesto que estos compuestos se transportan incluidos en las lipoproteínas, sus concentraciones plasmáticas están influidas por variaciones en las concentraciones de estas partículas. Por tanto, los datos que suelen compararse para valorar la síntesis suelen ser los ratios precursores/colesterol. (Miettinen y cols.,2003; Thompson,2004).

2.2-LOS ESTEROLES Y SU RELACIÓN CON EL MECANISMO DE ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL

El proceso de absorción del colesterol a nivel intestinal sigue siendo el menos comprendido del metabolismo del colesterol y sus bases no están tan definidas como en el caso de la síntesis. El proceso de absorción consta de numerosos pasos muy regulados y condicionados por factores fisiológicos y dependientes de la dieta (Sanclemente y cols.,2009).

La eficiencia de la absorción se encuentra determinada por el efecto neto del transporte bidireccional de las moléculas de colesterol a través de los enterocitos (células del intestino). Es importante destacar la relativa ineficiencia en el mecanismo de absorción del colesterol, ya que en promedio se absorbe sólo un 40%, aunque con una variabilidad que oscila entre el 20% y el 80% (Ros,2006).

Los esteroides procedentes de las plantas, también llamados fitoesteroides, comparten el mismo mecanismo de absorción a nivel intestinal que el colesterol. La Figura 5 esquematiza este proceso donde también se muestran las estructuras de los fitoesteroides determinados en este trabajo (campesterol, estigmasterol, sitostanol y sitosterol). Este proceso se divide en tres fases: intraluminal (referida a la que ocurre en la cavidad del intestino), mucosa (referida a la capa que recubre la célula) e intracelular (la que ocurre en el interior del enterocito). Por otro lado, el colesterol, los esteroides y otros compuestos que escapan de la absorción intestinal, se excretan como esteroides

fecales representando la principal ruta para la eliminación corporal de esteroides (Ros,2000).

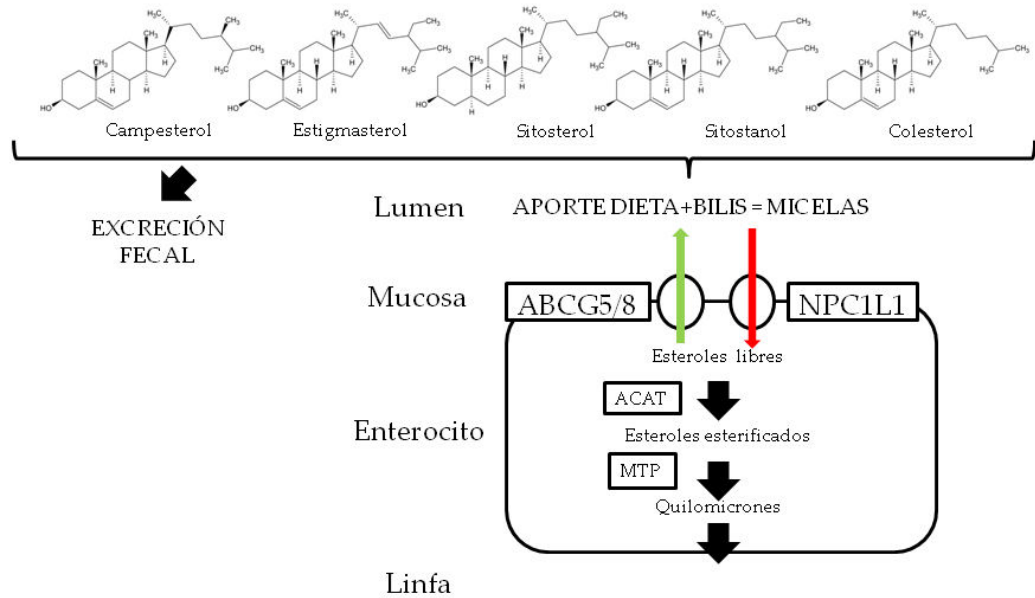


Figura 5. Esquema del proceso de absorción del colesterol a nivel intestinal

Las fases principales de este proceso se explican detalladamente a continuación:

2.2.1-Fase intraluminal

Esta fase se caracteriza por la formación de micelas (agrupación de moléculas formadas por grupos polares que quedan en la superficie y grupos apolares que quedan inmersos en el interior). Estas micelas se forman por la acción de los ácidos biliares y tienen la función de transportar los lípidos insolubles en el medio acuoso intestinal (como el colesterol y los triglicéridos) al interior del enterocito (Boix y cols.,2005).

2.2.2-Fase mucosa

En esta fase se produce el paso de las micelas formadas en la etapa anterior desde el lumen hasta el citoplasma del enterocito. Tradicionalmente, se ha creído que este proceso tenía lugar por el fenómenos de difusión pasiva, aunque algunos estudios indicaban la presencia de un transportador proteínico (Ros,2000). Estos estudios revelaron la existencia de una proteína localizada en la membrana del enterocito denominada Niemann-Pick C1-like1 (NPC1L1) que juega un papel crucial en el transporte de colesterol hasta el interior de la célula (Altmann y cols.,2004).

Actualmente, también se sabe que existen otros dos transportadores de membrana como *ATP-binding cassette* G5 y G8 (ABCG5 y ABCG8) que actúan conjuntamente como un heterodímero sacando a los esteroides fuera de los enterocitos (Sanclemente y cols.,2009).

El argumento a favor de la existencia de unas proteínas de transporte activo se basaba en parte en la especificidad de la absorción del colesterol ya que se sabía que los fitoesteroides presentes en la dieta, estructuralmente muy similares al colesterol, se absorbían mucho menos.

Un ejemplo de esto es que la absorción intestinal del sitosterol es solamente un 5% y tan solo se diferencia del colesterol en el grupo etilo del carbono 24, del mismo modo ocurre con el estigmasterol que aparte de este grupo etilo, presenta un doble enlace entre los carbonos 22 y 23 y el

campesterol, que solamente se diferencia del colesterol en el grupo metilo que tiene en el carbono 24 (Ros,2006; Sanclemente y cols.,2009).

A pesar de que los fitoesteroles se absorben de un modo mucho más ineficiente que el colesterol, el mecanismo de absorción es similar, ya que su origen es exclusivamente dietético. Por este motivo, el cociente fitoesteroles/colesterol en el plasma o suero puede utilizarse como un marcador fiable de la absorción del colesterol a nivel intestinal (Miettinen y cols.,1990).

2.2.3-Fase intracelular

Una vez en el interior del enterocito, el colesterol y los esteroides son esterificados por la acil-CoA-colesterol-acil-transferasa (ACAT). Esta enzima es altamente específica para esta molécula y se incorpora a los procesos de ensamblaje intracelular de los quilomicrones (QM) (Lee y cols.,2000). Los quilomicrones son secretados a la linfa, desde donde se incorporan a la circulación sanguínea. El colesterol que no es esterificado en el enterocito puede ser transportado de nuevo al lumen intestinal por medio de los transportadores de membrana ABCG5 y ABCG8. Además, la actividad esterificadora del enterocito puede ser también un importante regulador puesto que aumenta el gradiente de difusión para la entrada de colesterol intraluminal en la célula intestinal (Ros,2000).

2.3-LOS ESTEROLES Y LOS PROCESOS DE DEGRADACIÓN DEL COLESTEROL

La síntesis de ácidos biliares es uno de los mecanismos predominantes en el organismo para degradar el colesterol y constituye la principal vía catabólica del mismo. La síntesis de estos compuestos es importante también para solubilizar el colesterol, los lípidos y otros nutrientes esenciales que se ingieren con la dieta aunque no resulta suficiente para compensar los excesos derivados de una ingesta masiva de los mismos (King,2014).

Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado mediante una serie de vías metabólicas en las que intervienen más de 15 reacciones enzimáticas. Estas transformaciones conllevan al menos tres pasos fundamentales: el primero es la adición de varios grupos hidroxilo a la molécula del colesterol, el segundo suele ser la oxidación y el acortamiento de la cadena lateral del carbono 17 y por último la saturación del núcleo esteroide y epimerización del hidroxilo en posición 3 β (Pocoví y cols.,2004).

Los esteroides determinados en este trabajo son productos intermedios de estas reacciones de transformación del colesterol a ácidos biliares. Al tener varios grupos -OH de más que el resto de los esteroides estudiados, suelen recibir el nombre de hidroxiesteroides. En muchas de estas reacciones de degradación participan enzimas de la familia del citocromo P450. Estas enzimas son una familia de hemoproteínas ampliamente distribuidas en todas las células de todas las especies aunque con especial presencia en el hígado, donde son las responsables del metabolismo oxidativo tanto de compuestos endógenos como xenobióticos (Gomez-Lechon y cols.,2003).

Un fallo en su funcionamiento, provoca la acumulación de algunos compuestos intermedios, a la vez que escasez de productos finales. Este hecho acaba resultando perjudicial para el organismo (Pikuleva y cols.,2013).

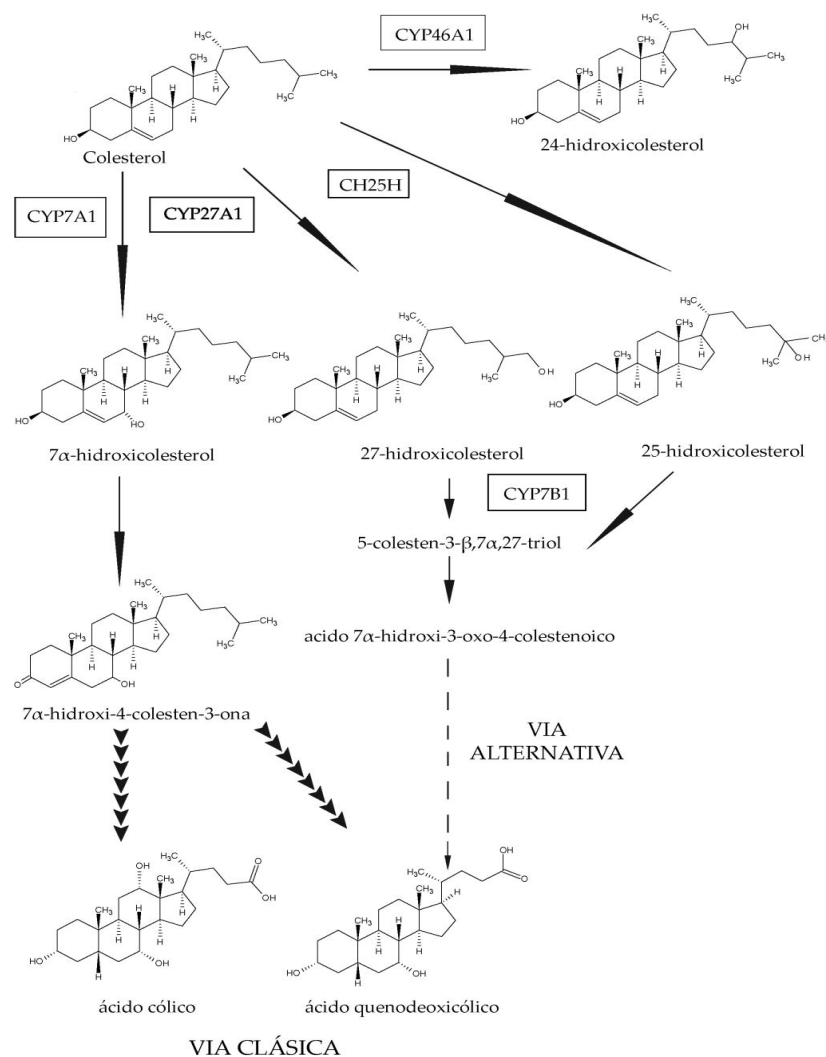


Figura 6. Esquema de los procesos de formación de los hidroxiesteros y su participación como intermedios en el proceso de síntesis de ácidos biliares

Como se muestra en la Figura 6, el 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona puede informar de la actividad de la enzima colesterol 7 α -hidroxilasa. Esta enzima cataliza el primer paso de la ruta principal de síntesis de ácidos biliares en el organismo en el hígado. Un mal funcionamiento de esta enzima provoca la acumulación de este analito y elevación de los niveles circulantes del mismo, así como la reactivación de otras rutas alternativas de la síntesis de ácidos biliares (Lövgren-Sandblom y cols.,2007).

Algunos hidroxiesteroides han demostrado ser marcadores del metabolismo del colesterol en órganos específicos. Este es el caso del 24-hidroxicolesterol, que es un compuesto generado para eliminar el exceso del colesterol en el cerebro. Niveles circulantes elevados de este analito, se han relacionado con procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y enfermedades desmielinizantes (Bjorkhem y cols.,2004; Burkard y cols.,2004).

El 25 y 27-hidroxicolesterol se han postulado como sustratos del enzima que codifica en gen *Cyp7b1*, perteneciente a la familia citocromo P450 (Stiles y cols.,2009). Una acumulación de 27-hidroxicolesterol, está relacionada con lesiones ateroscleróticas en pacientes con Hipercolesterolemia (Umetani y cols.,2007). Por otro lado, niveles elevados de 25-hidroxicolesterol se relacionan con apoptosis en células musculares lisas del tejido vascular (Appukuttan y cols.,2013). También se sabe que este compuesto actúa como regulador de la síntesis del colesterol (Shibata y cols.,2013) y está relacionado con la activación de los macrófagos para la formación de las células espumosas en las placas de ateroma (Gold y cols.,2012).

Otro compuesto marcador del metabolismo del colesterol y estudiado en este trabajo es el colestanol.

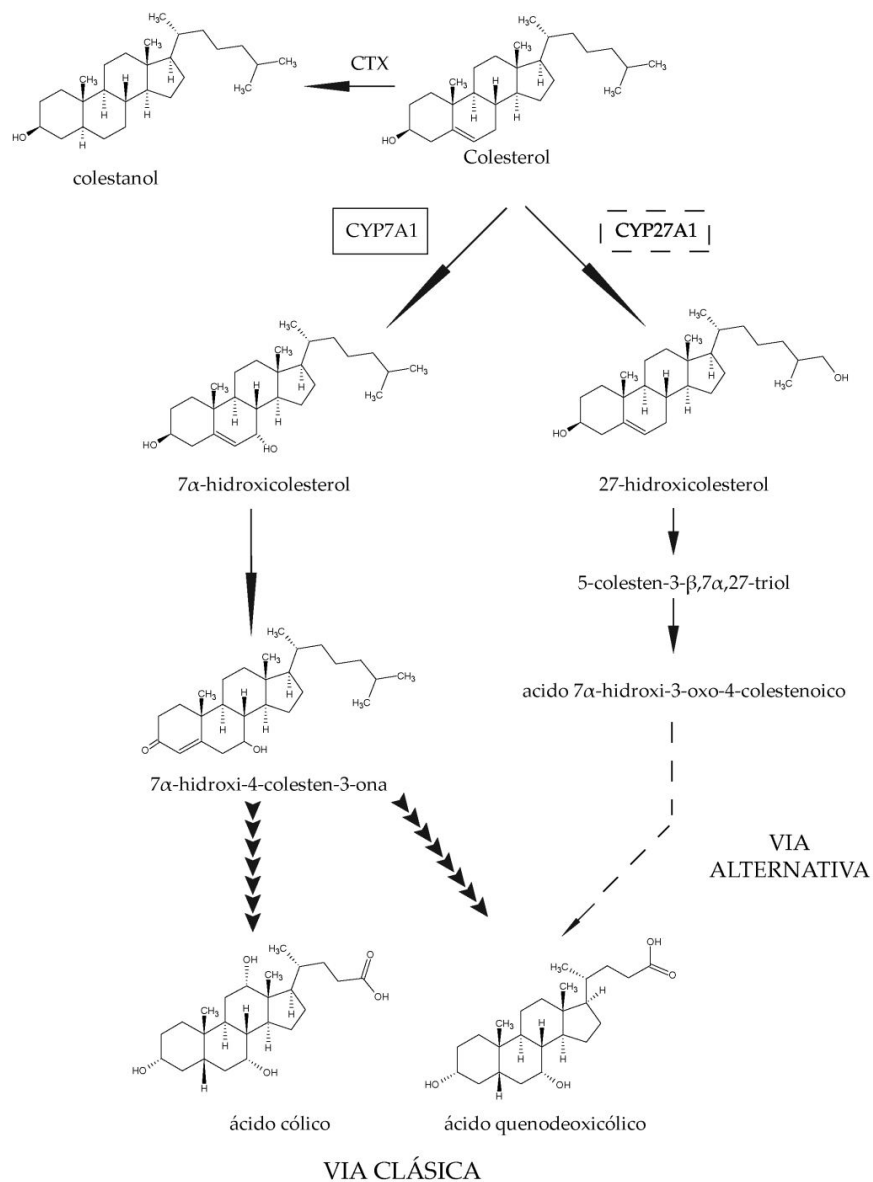


Figura 7.Representación de las rutas de síntesis de ácidos biliares: vía clásica y vía alternativa. Puede síntesis de colestanol cuando la vía alternativa está bloqueada

Como puede verse en la Figura 7, existen dos rutas posibles en la síntesis de ácidos biliares. Una de ellas es la mayoritaria para casi todos los seres vivos y por ello recibe el nombre de vía clásica, la otra vía recibe el nombre de vía alternativa y en humanos solamente supone una contribución del 10% a la síntesis global (Honda y cols.,2004).

La consecuencia del fallo de la enzima *Cyp27a1* es la acumulación de colesterol forzando su transformación por otras vías (la clásica) o transformándolo en otros analitos como el colestanol. Esto sucede en la enfermedad denominada xantomatosis cerebrotendinosa (CTX). Se ha demostrado que este derivado del colesterol tiende a acumularse en tejidos como el cerebro, pulmón y tendones cuando una ruta de degradación del colesterol está parcialmente bloqueada por la carencia o mal funcionamiento del enzima *Cyp27a1* (Salen y cols.,1972).

Este compuesto, en ocasiones también se ha utilizado como marcador de la absorción de colesterol (Miettinen y cols.,2011).

3.-TRATAMIENTO DE MUESTRA EN EL ANÁLISIS DE ESTEROLES

El interés en la determinación de los esteroides puede situarse en 1940 cuando Bergström y Wintersteiner comenzaron a estudiar metabolitos derivados del colesterol en matrices biológicas (Bergstrom y cols.,1942).

Todos los tratamientos de muestra enfocados a la determinación de esteroides en tejidos o fluidos biológicos, requieren una extracción inicial con disolvente orgánico, seguido de una hidrólisis alcalina en la mayoría de los casos. Posteriormente, y con el fin de preparar la muestra para la etapa de cromatografía y detección posterior suele llevarse a cabo una extracción en fase sólida. Un esquema de estos procedimientos se muestra en la Figura 8.

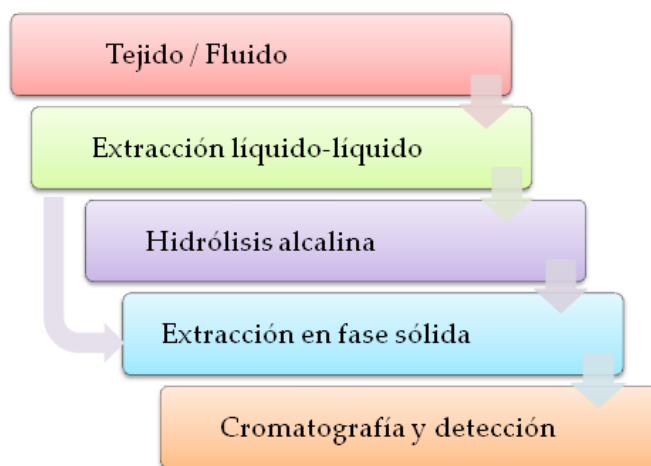


Figura 8. Esquema de los pasos seguidos en un tratamiento de muestra para esteroides en matrices biológicas.

El tratamiento de la muestra para la determinación de esteroides supone un reto analítico importante debido principalmente a dos razones. La primera es que son compuestos que se encuentran a baja concentración respecto al

colesterol (1000 veces más concentrado) tanto en los tejidos como en los fluidos estudiados y siempre va a suponer una interferencia en el análisis. La segunda, es el riesgo de autoxidación del colesterol a lo largo del proceso. Se sabe que la posición 7 del anillo de la molécula es muy susceptible de ser atacada por el oxígeno molecular provocando la generación de nuevos hidroxiesteroides o subproductos no deseados (artefactos).

A continuación se explica con más detalle los procedimientos más utilizados en cada una de estas etapas.

3.1- MATRICES DE TRABAJO

3.1.1-Hígado

El hígado es una matriz compleja, este hecho está relacionado con la función que realiza. Se le puede considerar como el centro metabólico del organismo. Se compone de numerosos vasos sanguíneos, agua, lípidos, azúcares, proteínas y numerosos iones. Por este motivo, aislar los analitos de interés requiere primero de una homogeneización del tejido seguida de un minucioso proceso de extracción (King,2014). Un esquema del hígado y sus componentes se muestra en la Figura 9.

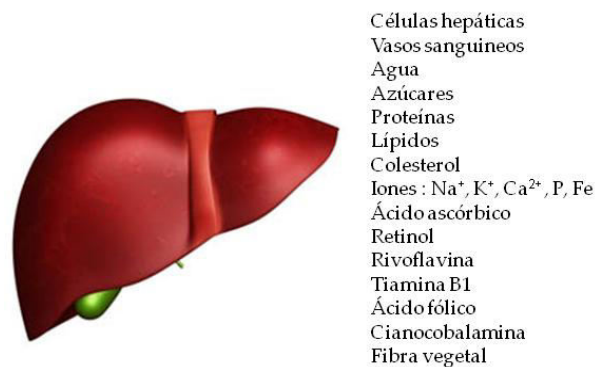


Figura 9. Representación esquemática del hígado y de los compuestos metabolizados en él

3.1.2-Suero y plasma

El suero y plasma son partes importantes de la sangre. La sangre se compone de plasma, suero, glóbulos blancos y globos rojos. Cuando la sangre es sometida a una centrifugación se obtiene una parte celular que supone un 40% del volumen y una parte acuosa. Esta fracción acuosa, a su vez, se compone de un 70% de proteínas, 20% de sustancias orgánicas y 10% de sustancias inorgánicas (King,2014).

La principal diferencia entre plasma y suero se encuentra en sus factores de coagulación. Existe una sustancia llamada fibrinógeno que es esencial en la coagulación de la sangre. El plasma contiene este fibrinógeno, el suero no. Cuando se separan el suero y plasma de la sangre, el plasma aún conserva el fibrinógeno que ayuda a la coagulación, mientras que el suero es la parte de la sangre que queda después de quitar este fibrinógeno (King,2014). Un esquema de la composición de la sangre se muestra en la Figura 10.

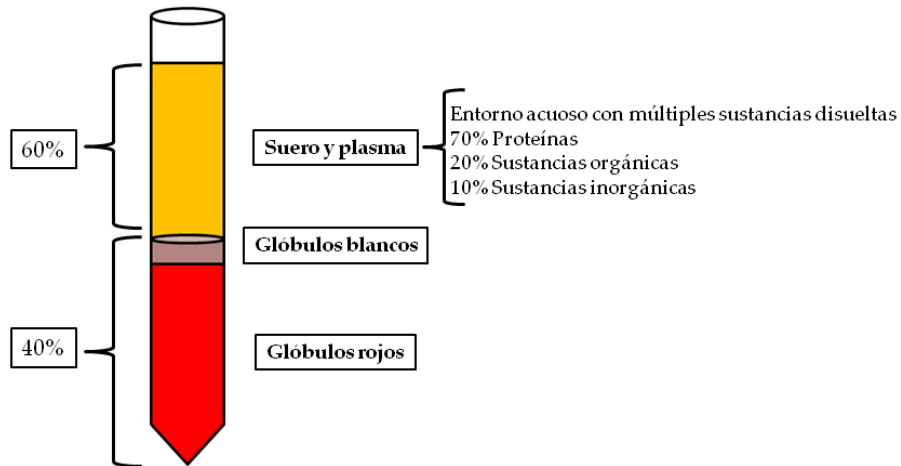


Figura 10. Esquema de la composición del suero y plasma tras separar la parte celular de la sangre

- *Lipoproteínas*

Como se explicó anteriormente, los compuestos que son procesados en el hígado se transportan al resto de los órganos a través del torrente sanguíneo. En el caso de los esteroides al ser moléculas no solubles en agua, forman agregados recubiertos de proteínas que permiten su transporte a la sangre y que reciben el nombre de lipoproteínas.

Las lipoproteínas son agregados esféricos que contienen una capa externa de moléculas anfipáticas, proteínas (denominadas apoproteínas), ésteres de colesterol y triglicéridos. En el interior de estas lipoproteínas el colesterol es transportado en dos formas, que ocupan diferentes sitios en la partícula; el colesterol libre se localiza principalmente en la superficie, junto con fosfolípidos y proteínas, mientras que el colesterol esterificado y los

triglicéridos forman parte de la matriz hidrofóbica de las lipoproteínas. En la Figura 11 se muestra un esquema de una lipoproteína.

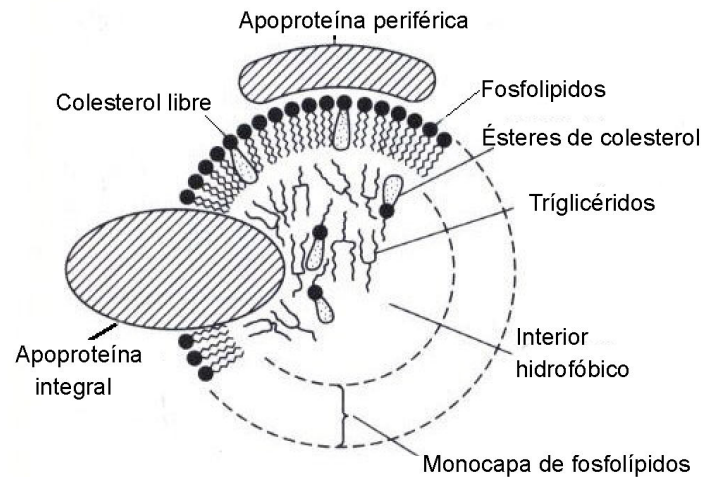


Figura 11. Esquema de la estructura y composición de una lipoproteína

Existen diferentes clases de lipoproteínas, un criterio de clasificación se basa en su densidad: existiendo cinco tipos principales de menor a mayor densidad y son: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Los quilomicrones (QM) procedentes del intestino van descargando sus triglicéridos (TG) en los tejidos por la acción de la enzima lipoprotein-lipasa. Los remanentes de QM formados se encargan de llevar el colesterol y los esteroides ingeridos en la dieta al hígado. En el hígado, el colesterol de la dieta y el sintetizado, se empaqueta con TG a los tejidos convirtiéndose en IDL y posteriormente en LDL. Las LDL transportan las dos terceras partes del colesterol circulante en el plasma y son las principales proveedoras de

colesterol al hígado y a los demás tejidos del organismo. El exceso de colesterol es retirado de las células por las HDL y es devuelto al hígado bien directamente o bien transfiriéndolo previamente a las LDL. Ambas partículas son captadas por el hígado mediante receptores específicos. A éste último se le conoce como “transporte reverso de colesterol” (línea azul) (Sanclemente y cols.,2009). Un esquema de este proceso de transporte se muestra en la Figura 12.

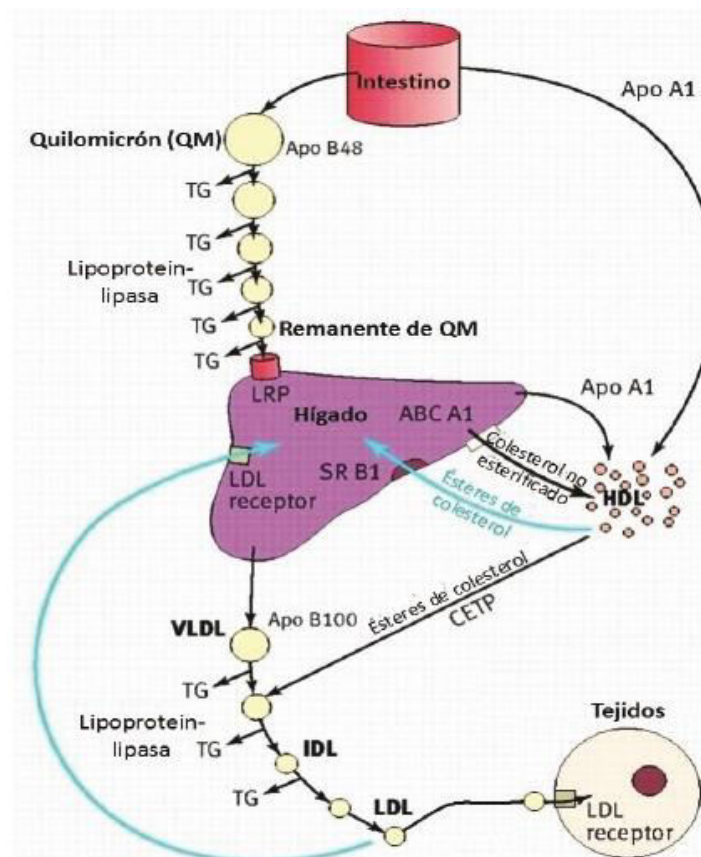


Figura 12. Esquema del metabolismo de las lipoproteínas en el organismo (Sanclemente y cols.,2009)

3.2-EXTRACCION DE TEJIDOS, SUERO Y PLASMA CON DISOLVENTES

Tanto en el hígado como en el suero y plasma los esteroides se encuentran principalmente formando parte de las lipoproteínas, esto complica su proceso de extracción debido a que para conseguir aislar al compuesto primero ha de romperse la interacción con la molécula que no se desea extraer, en este caso la proteína. Estas interacciones suelen ser en general débiles: fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno. En raras ocasiones son iónicas o covalentes. Por este motivo el disolvente que se elija ha de ser capaz de romper esas interacciones, mantener soluble al analito y no reaccionar con otros componentes de la matriz que ocasionen la aparición de otros productos no deseados (Christie,1993; Nelson,1993).

Como se ha explicado, los esteroides son lípidos hidrocarbonados, con una cadena alifática y con pocos grupos polares. Aunque en principio, es difícil predecir la capacidad extractante de un disolvente frente a un compuesto, los esteroides requieren de disolventes hidrocarbonados (hexano, tolueno o ciclohexano) para su completa extracción. En ocasiones admiten disolventes poco polares como dietil éter o cloroformo y en algunos casos también metanol (Christie,1993).

Lo más frecuente en los procedimientos de extracción de esteroides no es utilizar un solo disolvente puro sino mezclas de varios disolventes. Cada una de ellas tiene unas características específicas. Las más comúnmente empleadas para la extracción de esteroides de tejido o suero y plasma se exponen a continuación:

3.2.1-Cloroformo-Metanol

La mezcla cloroformo-metanol (2:1, v/v). Es la más comúnmente empleada para la extracción de una gran variedad de lípidos tanto de tejidos como de suero y plasma fue propuesta por Folch y sus colaboradores en 1957 y posteriormente fue mejorada por Bligh y Dyer en 1959. (Folch y cols.,1957; Bligh y cols.,1959).

La clave de su buen funcionamiento reside en dos características: la primera es la capacidad del cloroformo para asociarse con las moléculas polares y mantener solubles a las moléculas más apolares. La segunda es que estos disolventes forman con el agua un sistema de tres fases cloroformo-metanol-agua. Se recomienda utilizar una relación disolvente/tejido comprendida entre 20:1 hasta 50:1 (volumen/peso húmedo de tejido). Cuando se añade la proporción indicada de cloroformo-metanol al tejido o suero o plasma se consigue un sistema de una sola fase que tiene en cuenta el contenido en agua de la muestra a extraer. Es en esta única fase dónde reside la verdadera capacidad extractante de esta mezcla. Esta mezcla resultante se diluye con cloroformo y posteriormente agua para conseguir un sistema bifásico. Tras la centrifugación de la muestra, pueden apreciarse tres fases en el sistema: La fase inferior (cloroformo) contiene a los lípidos, en la fase superior (metanol/agua) se encuentran los contaminantes no lipídicos y la capa central recoge todas las proteínas presentes en la muestra. El inconveniente que presenta esta mezcla es que el cloroformo es un disolvente irritante y tóxico y ha de ser utilizado con cuidado.

3.2.2-Diclorometano-Metanol

A raíz del inconveniente que presentaba el cloroformo, se exploraron otras mezclas menos tóxicas como diclorometano-metanol (2:1, v/v), igualmente eficaz que la mezcla anterior porque el diclorometano tiene características parecidas al cloroformo y además no es tan tóxico. Posteriormente, McDonald y colaboradores desarrollaron un método muy específico para la extracción de una amplia gama de esteroides (hidroxiesteroides, precursores y fitoesteroides) en plasma basado en la mezcla diclorometano/metanol (1:1, v/v) (McDonald y cols.,2012).

3.3.3-Metil-tert-butil-eter (MTBE) -metanol-agua

En el 2008 Matyash propuso un método de extracción con el que se obtenían rendimientos similares al del método de Folch pero utilizando una mezcla de metil-tert-butil-eter (MTBE), metanol y agua. Este método mejoraba el método de Folch y Bligh-Dyer en dos aspectos: el primero era que los disolventes empleados tienen una menor toxicidad y el segundo, que al final del proceso, la fase que contiene los lípidos (MTBE) queda en la parte superior. Esta separación facilita su recuperación sin tener que atravesar la capa de proteínas, evitando así posibles contaminaciones y mejorando la reproducibilidad de las extracciones (Matyash y cols.,2008).

El método de Matyash ha cobrado especial importancia en los análisis de lipidómica ya que permite extraer una amplia variedad de lípidos de una manera más sencilla y reproducible (Whiley y cols.,2012).

Un esquema de la diferente distribución de las fases al final de ambos métodos se muestra en la Figura 13.

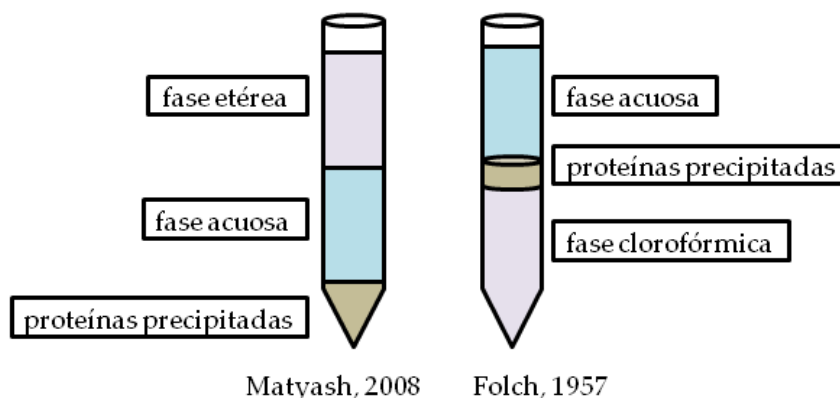


Figura 13. Vista esquemática de la distribución de fases resultante tras aplicar los métodos de (Matyash y cols.,2008) y (Folch y cols.,1957)

3.3.4-Hexano-Isopropanol

Siguiendo en la línea de encontrar mezclas con buena capacidad extractante pero sin ser excesivamente tóxica, está la mezcla hexano/isopropanol (3:2, v/v) muy utilizada para extracción de lípidos en muestras de hígado. Esta mezcla muestra incluso mejores rendimientos con las prostaglandinas que el método de Folch (Rada y cols.,2011).

3.3.5-Hexano-Metanol

La mezcla metanol/hexano (1:1, v/v) se ha utilizado satisfactoriamente para la extracción de lípidos en tejidos, aunque es escasamente utilizada debido a que miscibilidad entre el metanol y el hexano no es completa (Sánchez-Pérez y cols.,2000).

3.3.6-Acetonitrilo-Metanol

Recientemente la mezcla acetonitrilo/metanol (1:1, v/v) mostró resultados satisfactorios extrayendo hidroxiesteros en plasma porque conseguía evitar bastante bien las oxidaciones del colesterol (Helmschrodt y cols.,2013).

3.3-HIDRÓLISIS ALCALINA

Los esteroides pueden existir en forma libre o formando ésteres con ácidos grasos, tanto en el hígado como en el suero y plasma.

La distribución de los compuestos libres o esterificados varía de unos órganos a otros. En general, los esteroides en el suero y plasma se encuentran prácticamente todos en su forma esterificada, como es el caso de los hidroxiesteros, los fitoesteros y en menor medida los precursores (Kuksis,2001). Sin embargo, en el hígado la distribución es algo diferente para el caso de los hidroxiesteros, donde se pueden encontrar diferencias incluso entre compuestos tan parecidos como el 25 y el 27-hidroxicolesterol. Este es el caso del 25-hidroxicolesterol que se encuentra predominantemente en su forma libre, y el 27-hidroxicolesterol se encuentra predominantemente en su forma esterificada (Li-Hawkins y cols.,2000).

Por otro lado, se ha demostrado que las formas libres son las biológicamente activas y en el caso de los precursores de colesterol, son las que reflejan el estado de la síntesis corporal del colesterol ya que como se explicó anteriormente, pasan al torrente sanguíneo a una velocidad

proporcional a la de su formación en la ruta de síntesis. Esto es debido a que la esterificación solamente ocurre en el hígado por la enzima aciltransferasa acilo (ACAT) y no en el plasma por la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) (Kempen y cols.,1988).

Desde el punto de vista del análisis clínico, puede ser interesante conocer la cantidad libre como la cantidad total de un analito tanto en hígado como en suero y plasma. La cantidad libre puede conocerse fácilmente realizando un tratamiento muestra que no incluya hidrólisis alcalina. Cuando se quiere conocer la concentración total de estos analitos, es decir, la suma de la cantidad del compuesto libre y el esterificado se necesita realizar una hidrólisis alcalina con la finalidad de romper el enlace éster. De este modo se libera el ácido graso unido al compuesto transformándose en su forma libre. En ocasiones también se utiliza como parámetro de medida la relación compuesto libre/compuesto esterificado para lo que también se necesita conocer la cantidad total (Kuksis,2001). Finalmente, la hidrólisis alcalina proporciona muestras más limpias, ya que elimina triacilglicéridos y fosfolípidos, generando a cambio ácidos grasos y ésteres metílicos que pueden ser separados fácilmente en una etapa de limpieza posterior (McDonald y cols.,2007).

Por otro lado, surgen dos inconvenientes que pueden complicar el tratamiento de muestra. Uno de ellos es que se añade un paso más, que aumenta las posibilidades de pérdida de analito, otro es la generación de artefactos. Estos artefactos son productos generados durante el proceso de análisis por la descomposición del colesterol bien por factores oxidativos

(autooxidación, fotooxidación o reacciones enzimáticas) o por causas relacionadas con el procedimiento experimental, esto es, durante el proceso de extracción y especialmente, durante el proceso de hidrólisis alcalina donde las altas temperaturas y el fuerte medio básico pueden ser determinantes (Brown y cols.,1996; Busch y cols.,2009).

3.4-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

El origen y desarrollo de la extracción en fase sólida es paralelo a la cromatografía. El fundamento de esta técnica se basa en la diferente afinidad que presenta el analito (o un compuesto de la matriz) entre una fase sólida y la muestra líquida. De modo que al hacer pasar la muestra a través de la fase sólida algunos compuestos quedarán retenidos en ella mientras que otros pasarán. Si lo que queda retenido en la fase sólida son los analitos, estos podrán ser eluidos posteriormente con un disolvente adecuado. Mientras que si lo que queda retenido son otros compuestos de la matriz que podrían actuar como interferencias en el análisis, se habrá obtenido el extracto purificado directamente. Por eso, esta técnica puede utilizarse tanto para la extracción de analitos de muestras líquidas como para la purificación de extractos que han sido obtenidos con otras técnicas de extracción.

La forma habitual de aplicación de esta técnica es mediante cartuchos de polietileno, similar al émbolo de una jeringuilla hipodérmica, en los que se coloca un pequeño lecho de sorbente o fase sólida. Las etapas básicas de aplicación de esta técnica se describen a continuación:

En primer lugar, la fase sólida es acondicionada mediante el paso del disolvente que empapa el sorbente, solvata los centros activos y prepara al sorbente para la recepción del analito. Seguidamente, un pequeño volumen de muestra o extracto se hace pasar a través de él, quedando retenidos los analitos (o las interferencias) según los casos. Finalmente, después de una etapa de lavado para eliminar los compuestos no deseados, los analitos son eluidos de la fase sólida y concentrados en un pequeño volumen de disolvente. Un esquema del proceso se muestra en la Figura 14.



Figura 14. Esquema de las etapas del proceso de extracción en fase sólida o SPE

En el análisis de esteroides mediante extracción en fase sólida para el se han empleado tanto fases normales, fases normales con mecanismos de débil intercambio catiónico, fases reversas y fases híbridas (Honda y cols.,2010).

En este estudio, se ha evaluado el comportamiento de las distintas fases estacionarias con el objetivo de evaluar la mejor capacidad de retención de los esteroides y la mínima retención de las interferencias. Los sorbentes utilizados y sus características se describen a continuación.

3.4.1-Cartuchos de sílica

La mayoría de los analitos orgánicos tienen grupos funcionales polares que pueden ser aprovechados para la separación en fase normal. En la Figura 15, se muestra un esquema de las interacciones que se producen en este tipo de fase recomendada para el análisis de hidroxisteroides. Estos compuestos poseen un grupo $-OH$ adicional respecto a los esteroides. Esta fase estacionaria proporciona diferentes niveles de selectividad cuando interesan separaciones de compuestos muy similares en estructura (McDonald y cols.,2007).

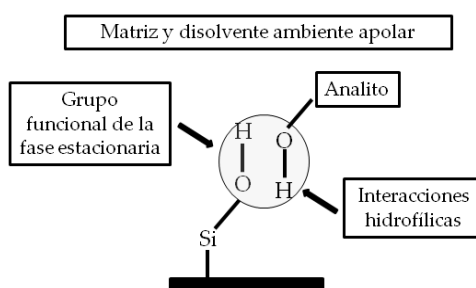


Figura15. Esquema de las interacciones de un analito en una fase normal

3.4.2-Cartuchos amino

Esta fase estacionaria combina las características de una fase normal con un débil intercambio catiónico. A las características comentadas en el apartado

anterior se suma la característica de poder establecer pequeñas interacciones electrostáticas. En este caso, resultan interesantes para aislar componentes de la matriz que quedan retenidos fuertemente en la fase estacionaria, como pueden ser los ácidos grasos procedentes del proceso de hidrólisis alcalina (McDonald y cols.,2012). Un esquema de estas interacciones se muestra en la Figura 16.

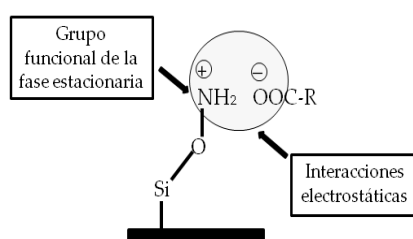


Figura 16. Esquema de las interacciones de un analito en una fase normal con débil intercambio catiónico

3.4.3-Cartuchos de fase reversa C_{18}

Durante muchos años este tipo de sorbentes se han empleado para un amplio rango de matrices, tanto alimentarias, medioambientales y biológicas. Este sorbente resulta adecuado para la extracción de analitos apolares o moderadamente polares. En este sentido, puede resultar una fase poco selectiva, pero esta característica resulta beneficiosa para la extracción de numerosos analitos de diferentes clases procedentes de la misma muestra. Es por esto que numerosos trabajos que determinaban esteroides en suero y plasma la escogieron como fase de trabajo (Kornel y cols.,2006; Balinova y cols.,2007; Zygler y cols.,2010). Un esquema de la estructura del sorbente y de las interacciones con los analitos puede verse en la Figura 17.

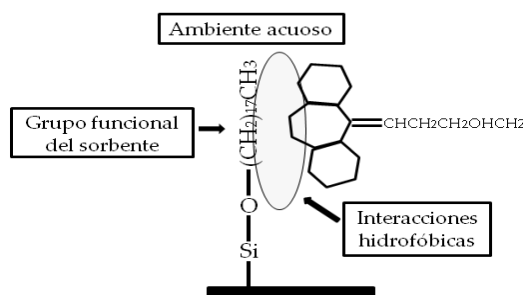


Figura 17. Esquema de las interacciones analito-sorbente en el caso de una fase reversa C_{18}

3.4.4-Cartuchos de fase polimérica

En comparación con el anterior, este relleno combina un balance hidrofílico-lipofílico (copolímero de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona) para una separación de compuestos ácidos, básicos y neutros en fase reversa que también ha sido empleada en el análisis de esteroides en plasma (AbuRuz y cols.,2003). Este tipo de sorbente es humectable y al trabajar con medios acuosos proporciona una capacidad de retención excelente para analitos en un amplio espectro de polaridades incluso si el lecho cromatográfico se seca durante el acondicionamiento o carga de la muestra. Esto supone una ventaja adicional que mejora mucho la reproducibilidad de los ensayos.

Un esquema de su estructura y de las interacciones que tienen lugar en la fase estacionaria pueden verse en la Figura 18.

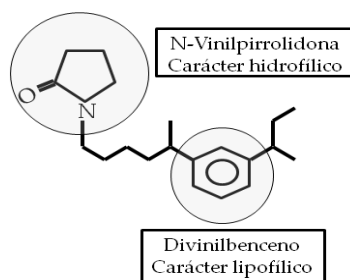


Figura 18. Esquema de las interacciones en el caso de una fase polimérica

3.4.5-Cartuchos de fase híbrida

El lecho se compone de un relleno de sílica recubierto con partículas de óxido de zirconio. Si se observa la estructura de un fosfolípido se puede ver que consiste en un grupo de cabeza polar, grupo fosfato y una gran cola hidrofóbica compuesta por ácidos grasos. El grupo fosfato actúa como una base muy fuerte de Lewis interaccionando con los átomos de zirconio que son buenos aceptores de electrones debido a sus orbitales d vacíos. Este sorbente, tiene la característica de eliminar los fosfolípidos procedentes del suero y del plasma (Pucci y cols.,2009). Un esquema de su estructura puede verse en la Figura 19.

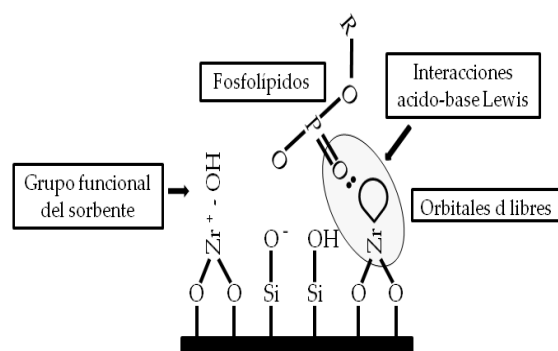


Figura 19. Esquema de las interacciones analito-sorbente en el caso de una fase híbrida

4.-ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Para poder entender los avances que se han hecho en el campo del análisis instrumental de los esteroides es necesario tener en cuenta su estructura y características químicas y ver que el reto es conseguir tenerlos en su estado nativo en el momento del análisis.

4.1-CROMATOGRAFÍA DE GASES

Hasta la década de los noventa, la mayor parte de los métodos instrumentales para la determinación de los esteroides utilizaban cromatografía de gases. Muchos de ellos empleaban un detector de ionización de llama (*FID*) (Kempen y cols.,1988; Phillips y cols.,1999; Domeño y cols.,2005), espectrometría de masas (*MS*) ó espectrometría de masas en tándem (*MS/MS*), en estos últimos casos el tipo de ionización más empleada fue impacto electrónico (*EI*) (Lund y cols.,1990).

La cromatografía de gases ofrece una buena resolución en la determinación de estos compuestos. Esto es una importante característica a tener en cuenta dada la gran cantidad de compuestos isómeros presentes en estas muestras. También presenta la ventaja de poder contar con librerías espectrales bien definidas que facilitan la identificación de los compuestos. Además es una técnica de fácil manejo, robusta y que puede ser implementada en cualquier laboratorio (McDonald y cols.,2012).

Sin embargo, la poca volatilidad de los esteroides supone un inconveniente. Este problema se supera mediante la derivatización de los compuestos con reactivos trimetilsilanos (TMS). Así, se generan los derivados de los compuestos compatibles con el análisis por esta técnica, pero supone alargar el proceso de tratamiento de la muestra. Además, hay que tener en cuenta que al introducir pasos adicionales en el tratamiento de muestra puede fomentar la formación de artefactos y comprometer la recuperación de algunos compuestos.

4.2-CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

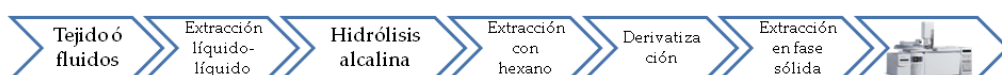
En las últimas décadas, la cromatografía de líquidos ha experimentado un gran avance por permitir la reducción de los procesos previos de tratamiento de muestra, ya que permite analizar a los analitos en estado nativo, sin necesidad de derivatización, por este motivo se ha convertido en la técnica de referencia para el análisis de muestras biológicas (McDonald y cols.,2007).

Otra ventaja que presenta esta técnica es que posibilita la automatización del proceso de tratamiento de muestra. Esto es posible gracias al reciente diseño de nuevas fases de extracción que además permiten ser acopladas al sistema cromatográfico. Entre diferentes estrategias desarrolladas destacan la introducción de los materiales de acceso restringido (*RAM*) (Boos y cols.,1997; Rudolphi y cols.,1997; Boos y cols.,1999) y los soportes de partículas grandes (LPS) (Ding y cols.,1999; Herman,2002). Ambos combinan mecanismos de

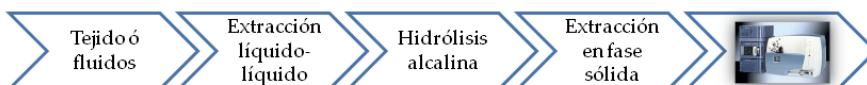
exclusión molecular con mecanismos de retención gobernados por interacciones hidrofóbicas o electrostáticas.

Acoplar estos sorbentes al sistema cromatográfico facilita la posibilidad de realizar análisis directos de muestras biológicas complejas de forma rutinaria. Como se muestra en la Figura 20, este hecho representa un enfoque muy atractivo que permite la automatización, simplificación y reducción de la etapa de tratamiento de la muestra.

- **CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG) (2 horas)**



- **CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (CL) (1 hora)**



- **ONLINE –MATERIAL ACCESO RESTRINGIDO –CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (ONLINE RAM-CL) (30 minutos)**



Figura 20. Evolución de los métodos instrumentales para el análisis de esteroides

Durante el desarrollo de la cromatografía de líquidos, el acoplamiento de la espectrometría de masas en estos sistemas supuso un reto por el inconveniente de tener que vaporizar la fase móvil procedente del cromatógrafo antes de entrar al espectrómetro.

Esto suponía una limitación ya existen pocos detectores adecuados para determinar esteroides, ya que la mayoría de estos compuestos carecen de un

grupo cromóforo que impide su detección por ultravioleta (*UV*) o fluorescencia. A cambio, los esteroides pueden ser modificados para absorber luz por derivatización o por la oxidación del alcohol a oxo-grupos que permitan su detección por ELSD (detector de luz dispersada tras evaporación) (Honda y cols.,2010).

Actualmente, la cromatografía de líquidos acoplada a la detección por espectrometría de masas y espectrometría de masas en tándem, se ha convertido en la técnica de referencia para el análisis de compuestos en matrices biológicas, productos de la industria farmacéutica, de la industria alimentaria y análisis ambientales. Esto es debido a su mayor sensibilidad y selectividad (Honda y cols.,2010).

Los analizadores utilizados para determinar estos analitos han sido los cuadrupolos y trampas de iones. Pero cuando se quiere alcanzar mayores sensibilidades en modo barrido o full SCAN el analizador preferido es el tiempo de vuelo (TOF) por proporcionar una sensibilidad hasta 100 veces mayor en modo SCAN. Además, proporcionan la selectividad necesaria para llevar a cabo una identificación eficiente de compuestos en muestras complejas. Este último analizador es el preferido en los campos de la proteómica y metabolómica actualmente en constante crecimiento (McDonald y cols.,2012; Whiley y cols.,2012).

Los modos de ionización empleados son a través de las sondas ESI (ionización por electrospray) y APCI (ionización química a presión atmosférica) o APPI (ionización química con fotoionización) (Lembcke y

cols.,2005; McDonald y cols.,2007; McDonald y cols.,2012). Los esteroides han sido determinados empleando todos estos tipos de ionizaciones, si bien, en algunas ocasiones se ha preferido la ionización por APCI (McDonald y cols.,2012). Recientemente, se ha desarrollado un nuevo tipo de sondas denominadas ESCI que combinan la ionización por electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI) dentro de la misma fuente de iones. Esto permite combinar las características de ambas en un mismo análisis (Short y cols.,2007).

4.2.1-Efectos matriz

El efecto matriz ocurre cuando uno o más constituyentes de la matriz de un analito afecta a la detección y/o determinación de un parámetro analítico. Normalmente, los componentes que provocan este efecto permanecen sin detectar y/o identificar. El efecto matriz se puede manifestar directamente por una disminución o incremento de la señal (lo cual afecta a la exactitud del método) o indirectamente como una perturbación sobre la señal (afecta a la precisión). Dichos efectos son causados por diferentes procesos físicos y/o químicos cuya eliminación puede ser difícil o incluso imposible.

- *Mecanismo de la aparición de los efectos matriz*

Este efecto resulta importante en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ya que la formación de iones en estado gaseoso a partir de las moléculas de analito disueltas en la fase móvil es un fenómeno complejo que depende en gran medida del resto de compuestos que coeluyen

con el analito. Estos compuestos pueden interferir en la ionización del analito, ocasionando aumentos o supresiones en su señal (Trufelli y cols.,2011).

- *Evaluación de los efectos matriz*

La evaluación de los efectos matriz puede llevarse a cabo mediante dos procedimientos uno cuantitativo y otro cualitativo. El procedimiento cuantitativo se basa en realizar un experimento estándar de recuperación en el que se preparan cuatro series de muestras diferentes: El primero de ellos consiste en una disolución de los analitos sin matriz. El segundo, en realizar el tratamiento de muestra a una muestra real dopando con una cantidad conocida de analitos al principio del proceso. El tercero se realiza igual que el segundo pero se dopa al final del proceso y el cuarto consiste en una muestra real que ha pasado por todo el tratamiento de muestra pero no se ha dopado. Esta muestra, sirve para tener en cuenta la concentración de analitos endógenos de matriz. El procedimiento experimental y los cálculos realizados para cuantificar los efectos matriz se detallarán en los capítulos.

El procedimiento cualitativo consiste en realizar un experimento de infusión post columna. En este experimento se infunde una disolución de analito directamente en el espectrómetro a la vez que está eluyendo la muestra. De este modo se puede medir fácilmente el fenómeno de supresión ó aumento de señal y el tiempo en el que se produce (Trufelli y cols.,2011). De esta manera se puede obtener información del momento en el que eluyen las interferencias y si lo hacen con el analito a determinar. Un esquema de estos procedimientos se muestra en la Figura 21.

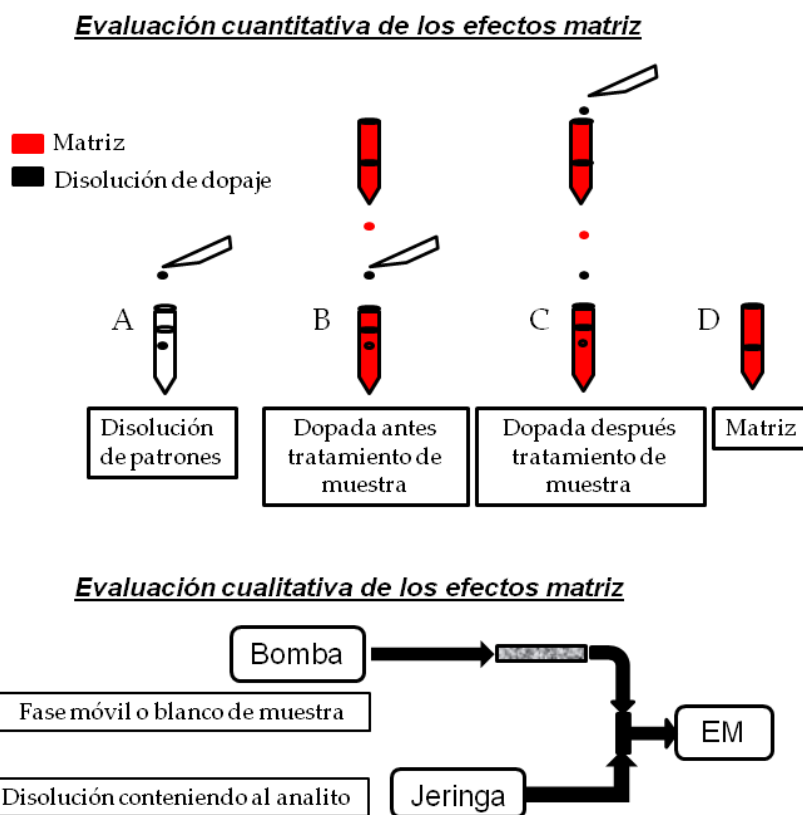


Figura 21. Esquema para la evaluación de los efectos matriz de forma cuantitativa y cualitativa

- *Estrategias para evitar los efectos matriz*

Aunque los efectos matriz pueden resultar en ocasiones muy difíciles de eliminar, se pueden aplicar diversas estrategias que permiten minimizarlos.

Una de ellas es a través del tratamiento de muestra, las extracciones líquido-líquido han demostrado ser una forma eficaz de separar selectivamente los analitos de interés de los compuestos interferencia. El empleo de diferentes fases estacionarias a lo largo del tratamiento de muestra también resulta de utilidad, ya que proporciona selectividad al método.

La segunda es controlar la etapa de cromatografía combinando diferentes tipos de fases móviles y gradientes y aprovechando también las diferentes características de las fases estacionarias.

Cuando las dos etapas anteriores no resultan suficientes, se necesita compensar las variaciones de la señal a través de la calibración. Para ello se requiere el uso de un estándar interno, al ser posible deuterado, por ser los que más similitudes presentan con el analito a determinar. Esta opción no siempre es posible de realizar porque en ocasiones, no es posible disponer del estándar deuterado. Tampoco hay que olvidar que diferentes analitos pueden mostrar un comportamiento diferente en una misma matriz por lo que cada uno requeriría de su propio estándar interno y muchas veces no es posible ponerlo en práctica. Para el caso de la determinación de esteroides, muchos autores han destacado la necesidad del uso de este tipo de estándares internos (McDonald y cols.,2007; Honda y cols.,2010; McDonald y cols.,2012).

Finalmente, en ocasiones puede ser interesante trabajar con la sonda APCI mejor que con ESI, ya que ha demostrado ser menos propensa a las variaciones de señal ocasionadas por los efectos matriz. Este fenómeno ha sido ampliamente documentado para sistemas líquidos-masas, pero también para el caso concreto de la determinación de esteroides en tejidos y fluidos biológicos (McDonald y cols.,2012).

5.-APLICACIONES

5.1-ESTUDIO DE LAS HIPERCOLESTEROLEMIAS FAMILIARES

La Hipercolesterolemia Familiar (HF) es una enfermedad hereditaria autosómica dominante que se caracteriza por la acumulación de colesterol en lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre, xantomas en tendones y un riesgo muy elevado de enfermedad coronaria.

La frecuencia de heterocigotos en población caucasiana es de 1/500, con lo cual se puede estimar que en España puede haber alrededor de 80.000 sujetos con HF y unos 10 millones en la población mundial, siendo por tanto una de las enfermedades monogénicas más frecuentes. La frecuencia de homocigotos es de 1/1.000.000 de la población, estos pacientes suele presentar enfermedad coronaria durante la primera o segunda década de vida (Pocoví y cols.,2004). Un resumen de estas características se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.Características de la Hipercolesterolemia Familiar (Pocoví y cols.,2004)

Hiperlipemia:	Tipo IIa
Herencia	Autosómica dominante
Frecuencia	Heterocigotos 1/500 En España 80.000-100.000 personas En el Mundo 10 millones de personas
Lípidos en plasma/suero:	Aumento de Colesterol y LDL Heterocigotos: Colesterol 300-550 mg/dL Homocigotos: Colesterol 650-1000 mg/dL Triglicéridos y cHDL: normales
Características clínicas	Xantomas tendinosos Enfermedad coronaria prematura
Defecto bioquímico	Mutaciones en el gen del rLDL

La utilización de las concentraciones de precursores de colesterol, fitoesteroles o hidroxiesteroles como nuevos parámetros aplicables en situaciones clínicas, aporta nuevas variables para la mejor caracterización de la HF. Su utilidad se ha demostrado en estudios de pequeño y mediano tamaño muestral, pero la necesidad de procesamiento previo de la muestra biológica para su posterior determinación mediante técnicas cromatográficas y el bajo grado de automatización que tenían hasta hace poco, reducían el alcance de estos estudios a casos particulares.

El Departamento de Química Analítica de la Escuela de Ingeniería y Arquitectura ha trabajado en colaboración con el Grupo de Lípidos de la Universidad de Zaragoza en un proyecto cuyo objetivo fue desarrollar un método para determinar de forma rápida compuestos relacionados con la homeostasis del colesterol para así poder relacionar su concentración en suero con un tipo de alteración genética común en los pacientes con HF. Hasta ahora la determinación de este tipo de compuestos era larga y compleja, lo que impedía el procesamiento de un elevado número de muestras para realizar buenos tratamientos estadísticos de los resultados.

5.2-ESTUDIO DEL GEN CYP7B1

El gen *Cyp7b1* (Citocromo P450, la familia 7, subfamilia b, polipéptido 1) codifica una de las enzimas del citocromo P450. Juega un papel importante en la síntesis de los ácidos biliares a partir del colesterol, en el desarrollo de la aterosclerosis, en el metabolismo de los neuroesteroides y en la síntesis de hormonas sexuales (Stiles y cols.,2009).

Este gen se expresa en el hígado, órganos reproductores y en el cerebro. Además regula la concentración de esteroides celulares y protege contra la toxicidad mediada por los hidroxiesteroides.

Cyp7b1 actúa hidroxilando los carbonos 6 y 7 del anillo B de los hidroxiesteroides y esteroides. Esta hidroxilación reduce la actividad biológica de estos sustratos y es esencial para la conversión a los productos finales (ácidos biliares) (Norlin y cols.,2004). La pérdida de la función de *Cyp7b1* se ha relacionado con el síndrome de resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2 (Pass y cols.,2002). De acuerdo con esto, los animales que carecen de *Cyp7b1* muestran un aumento de los niveles de 25 y 27-hidroxicolesterol en hígado, plasma y riñón (Li-Hawkins y cols.,2000). También tienen la incapacidad para convertir la dehidroepiandrosterona (DHEA) en su metabolito hidroxilado en diversos órganos como el cerebro, próstata y ovario (Rose y cols.,2001). Finalmente, también se ha observado una reducción de la actividad del gen ante la presencia de determinados ácidos grasos (Martinez-Beamonte y cols.,2013). Un resumen de las funciones del gen se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2-Roles fisiológicos del gen *Cyp7b1* (Stiles y cols.,2009)

FUNCION /TEJIDO	SUSTRATO
Síntesis de ácidos biliares	
Hígado	25-Hidroxicolesterol 27-Hidroxicolesterol
Metabolismo de hormonas esteroideas	
Cerebro	Pregnenolona Dehidroepiandrosterona
Metabolismo de receptor de estrógenos	
Próstata	5 α -androstane-3 β ,17 β -diol
Próstata	Dehidroepiandrosterona
Tejido vascular	27-Hidroxicolesterol
Producción de inmunoglobulinas	
Células inmunológicas	25-Hidroxicolesterol

Este trabajo también se ha realizado en colaboración con el Grupo Bases Moleculares de la Aterosclerosis del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza.

El interés por desarrollar un método analítico para la determinación de hidroxiesteroides en muestras de hígado y plasma es profundizar en el conocimiento de la ruta metabólica en la que participa este gen. También, identificar nuevos compuestos marcadores relacionados con un mal funcionamiento del mismo.

SECCIÓN II:

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Con el estudio llevado a cabo en esta tesis se pretende desarrollar una metodología analítica para la determinación de compuestos participantes en la homeostasis del colesterol. Los objetivos planteados para este estudio se detallan a continuación:

- Reducir el tiempo de tratamiento de muestra respecto a los métodos que utilizan cromatografía de gases mediante el desarrollo de un método analítico para la determinación de precursores de colesterol y fitoesteroles en suero humano utilizando cromatografía de líquidos y espectrometría de masas.
- Automatizar el proceso de limpieza de la muestra antes de la cromatografía, desarrollando un método online de tratamiento de muestra acoplado a cromatografía de

líquidos y espectrometría de masas para la determinación de precursores de colesterol y fitoesteroles en suero humano.

- Determinar la implicación del gen *Cyp7b1* en el metabolismo del colesterol. Para ello se desarrollará un método para analizar hidroxiesteroles en hígado y plasma de rata.
- Facilitar el tratamiento de muestra evitando realizar una biopsia hepática. Para ello se analizarán muestras de hígado y plasma de ratas en diversas situaciones metabólicas (ayuno largo y postprandial) de individuos sanos, de ratas con una alteración en el metabolismo del colesterol (ausencia del gen *Cyp7b1*) y ratas sometidas a terapia génica (individuos con ausencia del gen *Cyp7b1* pero portadoras de un plásmido que realiza su función) y se correlacionará estadísticamente su contenido para confirmar la hipótesis inicial de trabajo.
- Buscar alternativas a la etapa de hidrólisis alcalina de los hidroxiesteroles mediante métodos enzimáticos.
- Identificar nuevos compuestos marcadores de la mutación del gen *Cyp7b1* en hígado de rata.

SECCIÓN III:
EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 1: DETERMINACIÓN DE PRECURSORES DE COLESTEROL, FITOESTEROLES E HIDROXIESTEROLES EN SUERO HUMANO.

1-INTRODUCCIÓN

El capítulo se centra en el desarrollo de un método analítico rápido para determinar los precursores de colesterol, fitoesteroles e hidroxiesteroles en suero humano. Hasta hace unos años, el tratamiento de muestra para el análisis de esteroides en suero humano comprendía numerosas etapas. De todas ellas, la derivatización de los analitos a compuestos más volátiles era la limitante del proceso, pero a su vez era necesaria para poder analizar los compuestos por cromatografía de gases.

Con el desarrollo de la cromatografía de líquidos, esta etapa dejó de ser un inconveniente ya que esta técnica permitía el análisis de los compuestos sin derivatizar. Como consecuencia, se conseguía reducir el tiempo de tratamiento de muestra, lo que facilitaba el proceso de análisis y la obtención de resultados en menos tiempo. Este es un campo en el que aun se sigue trabajando.

Recientemente, los ultrasonidos han sido considerados como una técnica complementaria de tratamiento de muestra, ya que han conseguido acelerar procesos como la hidrólisis alcalina que constituye otra de las etapas críticas en el análisis de esteroides (Orozco-Solano y cols.,2010; de Castro y cols.,2011; Mendiara y cols.,2012).

El éxito de la técnica reside en el fenómeno de la cavitación, que es el fenómeno provocado por el movimiento de las ondas de sonido a través de un medio. La comunicación de esa energía entre unas moléculas y otras, va creando ciclos de expansión y compresión. Es durante este proceso cuando se forman burbujas que crecen, colapsan e implosionan generando una energía capaz de provocar cambios en los sistemas (Mason y cols.,2002; Arrojo y cols.,2007).

Otras aplicaciones de los ultrasonidos van encaminadas a conseguir una forma más detectable de los analitos, de manera que también son útiles en procedimientos que incentivan la detección, como son las reacciones de esterificación, alquilación y formación de complejos (Fransson y cols.,1998; de Sousa y cols.,2001; Korn y cols.,2002; Ruiz-Jimenez y cols.,2003; Fiamegos y cols.,2004).

2-OBJETIVOS

El objetivo general del capítulo es desarrollar un método analítico para determinar esteroides libres y totales en muestras de suero humano mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. El propósito es reducir el tiempo de tratamiento de muestra respecto a los métodos que utilizan la cromatografía de gases.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Reducir el tiempo de reacción de hidrólisis alcalina mediante la aplicación de ultrasonidos.
- Elaborar un procedimiento de extracción en fase sólida que incluya la comparación de diferentes sorbentes para seleccionar el que mejores características muestre con los analitos estudiados.
- Determinar la concentración de esteroides libres y totales en muestras de suero humano y compararlo con los obtenidos por otros métodos analíticos.

3-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1-MATERIALES Y REACTIVOS

Los estándares utilizados fueron 7α -hidroxi-4-colesten-3-ona (pureza 99%, número CAS: 3862-25-7), 24-hidroxicolesterol (99%, 474-73-7) y 27-hidroxicolesterol (99%, 20380-11-1), fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EEUU). Desmosterol (85%, 303-04-2), lanosterol (97%, 79-63-0); colestanol (95%, 80-97-7), campesterol (65%, 474-62-4), estigmasterol (95%, 83-48-7), sitosterol (95%, 83-46-5), sitostanol (95%, 19466-47-8), colesterol (99%, 57-88-5), colesteril estearato (96%, 35602-69-8) y colesterol 26,26,26,27,27,27-(d6) (estándar interno, 97%, 60816-17-3), el hidróxido de potasio (85%, 1310-58-3) y el BHT (99%, 128-37-0) se adquirieron en Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los disolventes utilizados fueron metanol (calidad analítica para LCMS, 67-56-1), 2-propanol (LC-MS grade, 67-63-0), etanol (calidad analítica HPLC, 67-63-0), hexano (96%, 110-54-3), todos ellos provienen de Sharlab (Barcelona, España). El agua Milli-Q se suministraba por un equipo Milli-Q Plus 186 de Millipore (Billerica, MS, EEUU).

Se prepararon disoluciones de trabajo que contenían todos los esteroides estudiados a concentración de $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Todas las disoluciones necesarias tanto para la optimización como para la cuantificación se prepararon a partir de disoluciones patrón de los compuestos de aproximadamente $1000\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol excepto el colesteril estearato que se preparó en hexano. Todas ellas se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los cartuchos de extracción en fase sólida utilizados fueron DSC-18 (500mg/3mL), HybridSPE-Precipitation (30mg/1ml) proporcionados por Sigma-Aldrich (Madrid, España) y Oasis-HLB (30mg/1ml) de Waters (Milford, Massachusetts, EE.UU.).

3.2-INSTRUMENTOS

Se utilizó una balanza analítica GR-202-EC A&D adquirida en Instruments LTD (Tokio, Japón); una Centrífuga Selecta Centromix (Salamanca,España); un manifold de Waters (Milford,MA;EEUU) para el proceso de extracción en fase sólida; un vórtex Velp Scientifica Instruments 50-60 Hz (Usmate,MB;Italia); un Baño de Ultrasonidos Branson 3510 MTH (Fredericksburg, Virginia,USA), un espectrofotómetro Shimadzu UV 1700 PharmaSpec UV-Vis (Kyoto, Japón) para medir las absorbancias de las fracciones de lavado del proceso de extracción en fase sólida. Por último, un cromatógrafo de líquidos Alliance® 2795 acoplado a un espectrómetro de masas Quattro micro™ API triple cuadrupolo ambos de Waters (Milford, MA, EE.UU.)

3.3-POOL DE SUERO

El pool de suero fue obtenido tras la mezcla del suero individual de 200 pacientes. Fue administrado por la Unidad de Lípidos del Hospital Miguel Servet de Zaragoza y fue conservado en oscuridad a -80°C hasta su análisis. Todos los pacientes fueron informados y dieron su consentimiento por escrito

al protocolo aprobado por un comité de ética médica (Comité ético de Investigación Clínica de Aragón ECRR/00034, España).

3.4-TRATAMIENTO DE MUESTRA

El suero se descongela lentamente a temperatura ambiente y luego se agita unos segundos en el vórtex. Se pipetea 500 μ L y se mezclan con 1,5mL de una solución recién preparada de hidróxido de potasio 0,7M en etanol/agua Milli-Q (96:4, v/v). Seguidamente, se añaden 100 μ L de una disolución de estándar interno en metanol de 50 μ g \cdot g⁻¹ y 20 μ L de BHT en metanol de 1000 μ g \cdot g⁻¹. Todo ello se introduce en un baño de ultrasonidos a 68°C durante 20 minutos donde se produce la reacción de hidrólisis alcalina. Tras esto, las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente y se añade 1mL de agua Milli-Q y 3mL de hexano. Esta mezcla se vuelve a agitar unos segundos en el vórtex y se centrifuga durante 20 minutos a 3600 rpm. Tras esto, se recupera la fase superior y se trasvasa a un tubo de vidrio y se lleva a sequedad aplicando una corriente de N₂ a 40°C gracias a la ayuda de un baño de agua. Seguidamente, se añaden 0,5mL de metanol y se introduce en un baño de ultrasonidos a T^a ambiente durante 5 minutos. Finalmente, se procede al proceso de extracción en fase sólida.

3.5-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

El extracto redisuelto en 0,5mL de metanol se hizo pasar a través de un cartucho DSC-18 (500mg/3mL). La abertura de salida del manifold y el vacío

se ajustaron de tal modo que el caudal de disolvente a través del cartucho fuera de 1,0-1,5 mL/min. El procedimiento detalla en la Tabla 1.1

Tabla 1.1. Protocolo de SPE DSC-18 (500mg/3mL) para la determinación esteroides en suero humano

Acondicionamiento	3 mL metanol/agua Milli-Q (5:95, v/v)
Carga	0,5 mL extracto en metanol
Lavado	2mL de metanol/agua Milli-Q (20:80, v/v)
Recuperación	1,5mL de 2-propanol

El 1,5mL de 2-propanol recuperado se concentró hasta 0,5mL aplicando una corriente de N₂ a 40°C. Esta temperatura se mantenía gracias a la ayuda de un baño de agua. Tras este paso, la muestra quedaba lista para su análisis cromatográfico.

3.6-ANÁLISIS POR LC/MS

Los parámetros instrumentales empleados en la cromatografía y detección así como los valores de m/z y tiempo de retención se muestran en la Tabla 1.2. El software MassLynx v.4.1 de Waters se utilizó para adquirir y procesar los datos.

Tabla 1.2. Condiciones para la determinación de los esteroides estudiados en suero humano

Columna	Symmetry™ C18 150 mm x 2,1 mm x 3,5 μm				
Temperatura de la columna	40°C				
Temperatura de la muestra	10°C				
Volumen de inyección	15μL				
Fase móvil	Disolvente A		Metanol		
	Disolvente B		Agua Milli-Q		
	Caudal		0,300 mL/min		
Gradiente	Tiempo (min)		Disolvente A (% v/v)		
	0,00		85		
	3,00		85		
	13,00		100		
	13,10		85		
	20,00		85		
Interfase	APCI				
Modo de detección	SIR				
Modo de ionización	positivo				
Voltaje de corona	10μA				
Temperatura de desolvatación	600°C				
Caudal de gas de desolvatación	600L/h				
Caudal de gas de cono	60L/h				
Temperatura fuente	130°C				
Compuesto	Peso molecular	m/z	Mecanismo	Modo	Vcono
7α-hidroxi-4-colesten-3-ona	400,6	401,6	[M+H] ⁺	APCI+	20
24-hidroxicolesterol	402,6	367,6	[M+H-2H2O] ⁺	APCI+	20
27-hidroxicolesterol	402,6	385,6	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	20
Desmosterol	384,6	367,6	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	20
Lanosterol	426,4	409,6	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	20
Colestanol	388,7	371,6	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	20
Estigmasterol	412,7	395,6	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	20
Campesterol	400,6	383,6	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	20
Sitosterol	414,7	397,6	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	20
Sitostanol	416,7	399,6	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	20
Colesterol	386,7	369,6	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	20
Colesteril estearato	653,1	675,3	[M-H+Na] ⁺	APCI+	20

3.7-PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO

3.7.1-Curva de calibrado y rango lineal

La curva de calibrado se preparó usando suero deslipidificado como disolvente. Este tipo de suero se prepara aplicando el método de Folch al suero, para eliminar la fracción lipídica (Folch y cols.,1957). El disolvente que se recupera tras el proceso sirve para simular las condiciones de los analitos en el suero y se adapta al comportamiento que pueden tener durante el proceso de ionización en la etapa de detección. Con el suero deslipidificado obtenido, se prepararon disoluciones con concentraciones en el intervalo desde $10\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ hasta $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. A cada punto de la recta se le añadieron $4,5\mu\text{L}$ de colesterol 26,26,26,27,27,27-(d6) de una disolución de $997\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol. El rango lineal se determinó con 6 puntos de calibración. Las disoluciones preparadas se inyectaron de forma aleatoria por triplicado.

3.7.2-Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir del ruido observado en las líneas base de los cromatogramas correspondientes, como tres y diez veces la desviación estándar del blanco, respectivamente (Miller,2002).

3.7.3-Precisión: Repetibilidad y precisión intermedia

La repetibilidad del método se calculó ejecutando el método el mismo día (n=6). Para ello el suero deslipidificado se dopó con una concentración de analitos representativa de la concentración que contiene el suero. Estos valores se muestran en las Tablas 1.4 y 1.5. La precisión intermedia se determinó realizando este procedimiento durante tres días (n=3).

3.7.4-Recuperación y exactitud

De la misma manera que en el apartado anterior, el cálculo de la recuperación (n=3) se realizó con suero deslipidificado dopado a niveles de concentración similares a los que se encuentran en el suero y con suero deslipidificado sin dopar. Estos valores se muestran en las Tablas 1.4 y 1.5. También se determinó la exactitud del método (n=5). La ecuación que se utilizó para calcular la exactitud fue:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Valor interpolado} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \quad (1)$$

3.8-ANÁLISIS DE ESTEROLES LIBRES Y TOTALES

Siguiendo el tratamiento de muestra propuesto se determinó la concentración de esteroides libres y totales en el pool de suero proporcionado. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar.

4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevaron a cabo varias alternativas experimentales a lo largo del desarrollo del método. La Figura 1.2 muestra el esquema experimental llevado a cabo.

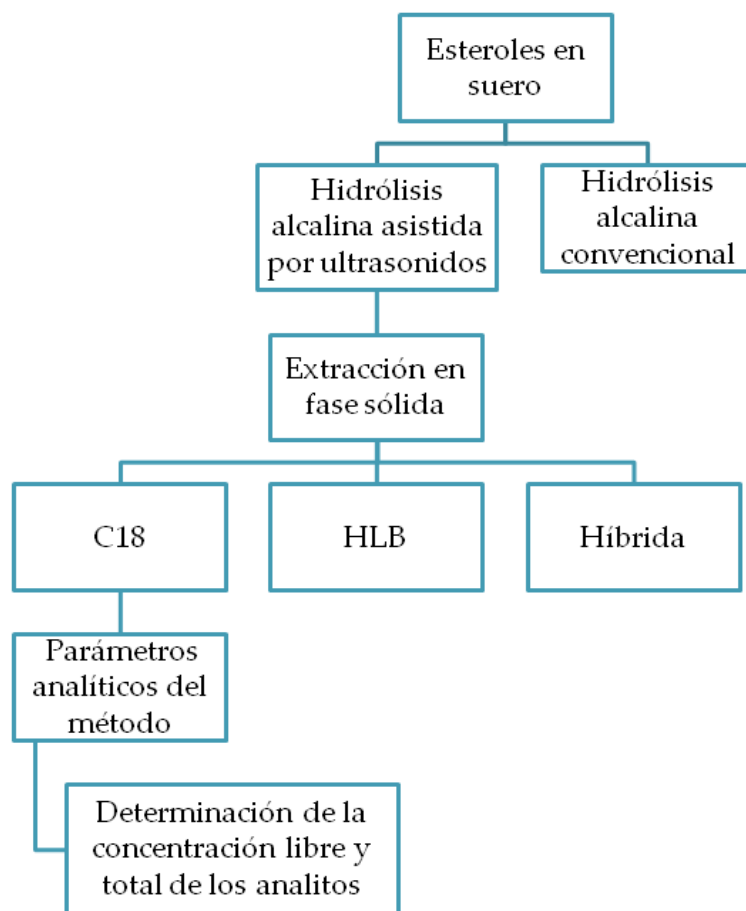


Figura 1.2. Esquema del proceso experimental llevado a cabo para el desarrollo del método

4.1-HIDRÓLISIS ALCALINA ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

Como se ha explicado anteriormente, la mayoría de los esteroides en el suero se encuentran en forma esterificada con ácidos grasos (Lin y cols.,2010). Tenerlos en su forma libre facilita tanto su detección como la evaluación de su contenido total. La determinación de la cantidad total y la relación entre la cantidad libre y total es interesante porque permite obtener información sobre el estado del metabolismo del colesterol (Kuksis,2001). La forma más utilizada de llevar a cabo la hidrólisis de los esteres de esteroles es a través de una reacción de hidrólisis alcalina con una base fuerte, que ocurre entre 22° y 100° C durante 1 ó 2 horas (Dzeletovic y cols.,1995; Lutjohann y cols.,1996; DeBarber y cols.,2008). Estudios recientes demostraron que este tipo de reacciones de hidrólisis son sensibles a la aplicación de ultrasonidos (de Castro y cols.,2011).

La optimización de la hidrólisis alcalina se llevó a cabo observando la conversión del patrón colesteril estearato en a su forma libre (colesterol). Se realizaron paralelamente y por triplicado, dos series de experimentos. Se partió de 100µL de una solución de colesteril estearato de 25µg·g⁻¹ en etanol y se mezcló con 1mL de una disolución de 0,7M de KOH en etanol/agua Milli-Q (96:4, v/v). Seguidamente se añadieron 100µL de una disolución de estándar interno de 50µg·g⁻¹ en metanol y 20µL de una disolución de BHT de 1000µg·g⁻¹ en metanol. Este antioxidante tiene la finalidad de evitar la formación de artefactos durante el proceso de hidrólisis (Busch y cols.,2009). La mezcla se agitó unos segundos en el vórtex.

La reacción se llevó a cabo en un baño de agua a 68°C. A uno de las series de experimentos se le aplicó ultrasonidos y al otro no. Durante el transcurso de la reacción se fueron tomando alícuotas cada 0,5,10,15,20,25,30,40,60,80 y 120 minutos. Las alícuotas obtenidas fueron analizadas posteriormente por LC/MS registrándose las masas de ambos analitos. El grado de conversión se calculó como se muestra en la ecuación 2.

$$Conversion = \frac{[coolesterol\ final]}{[coesteril\ estearato\ inicial]} \quad (2)$$

Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 1. Se observó que al utilizar el baño de ultrasonidos a 40 kHz y 68°C la conversión de coesteril estearato en coolesterol era muy próxima al 90% en el minuto 20; mientras que se necesitaron 50 minutos para conseguir el mismo grado de conversión sin aplicar ultrasonidos.

Tabla1. Porcentaje de conversión en función del tiempo obtenido al aplicar y no aplicar ultrasonidos a la reacción de hidrólisis alcalina

t (min)	Hidrólisis alcalina 68 °C	Hidrólisis alcalina asistida por ultrasonidos 68 °C
0	0	0
5	15 ± 1	31 ± 3
10	37 ± 2	52 ± 3
15	50 ± 2	73 ± 3
20	63 ± 2	86 ± 2
30	74 ± 2	90 ± 2
40	82 ± 1	92 ± 7
60	95 ± 5	94 ± 5
80	96 ± 4	94 ± 4
120	98 ± 4	95 ± 4

Por lo tanto, el uso de los ultrasonidos implica una reducción de 30 minutos en este punto del tratamiento de muestra.

4.2- ELECCIÓN DE LA FASE ESTACIONARIA EL PROCEDIMIENTO *SPE*

En este estudio, el interés se centró en el uso de fases reversas como C_{18} , poliméricas como *HLB* e híbridas. Para cada sorbente, los estudios se realizaron primero con disoluciones estándar y posteriormente se confirmó el resultado con muestras de suero.

4.2.1-Etapa de acondicionamiento y carga

- *Estudio con patrones*

Cuando se trabaja con analitos de baja polaridad lo recomendado en bibliografía es utilizar fases cuyo mecanismo de separación esté basado en la hidrofobicidad. Si se trabaja con una matriz acuosa, el cartucho se ha de acondicionar con un disolvente orgánico polar seguido de un equilibrado con agua, el lavado también se recomienda que se haga con disolventes acuosos o tampones suaves y la elución debe ser con disolventes polares. Si se emplean varios disolventes en la elución se recomienda utilizarlos en orden creciente de polaridad.

Se llevó a cabo un estudio experimental utilizando los tres tipos de sorbentes y se determinó el volumen y tipo de disolvente a ser usado en esta etapa. Se estudiaron dos tipos de disolvente: metanol y metanol/agua Milli-Q (5:95, v/v).

Pueden considerarse volúmenes de carga óptimos aquellos en los que la concentración de analitos a la salida del cartucho no supera el 1% de la concentración inicial de analito introducida en el mismo (Ortega y cols.,2001).

Se aplicaron 3mL de cada uno a los tres tipos de sorbentes. Posteriormente se cargaron 0,5mL de una disolución que contenía $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de todos los analitos en metanol. Se recogieron las fracciones a la salida del cartucho y se determinaron por *LC/MS*. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los cartuchos se acondicionaron con 3 mL de metanol/agua Milli-Q (5:95, v/v). Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos para las fases C_{18} y *HLB* se muestran en la Figura 1.3, los correspondientes a la fase híbrida no se representaron ya que es una fase diseñada para retener las interferencias de la muestra de suero, especialmente los fosfolípidos, y no a los analitos.

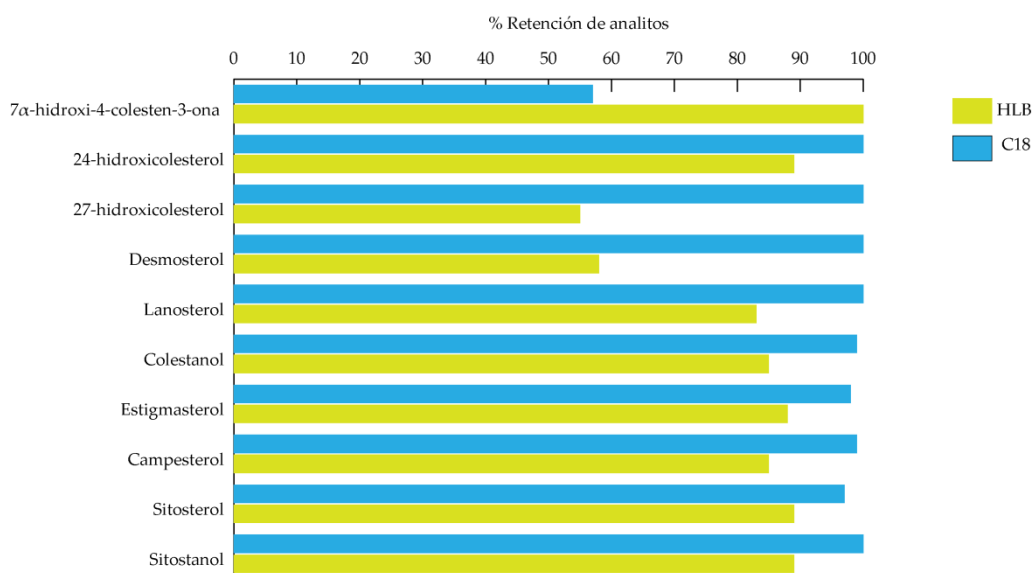


Figura 1.3. Porcentaje de analitos retenidos en la etapa de carga usando cartuchos C_{18} y *HLB*

Para la fase reversa C₁₈, se consiguió la completa retención de los analitos, salvo para el caso de 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona en el que un 40% no conseguía retenerse. Esto podría ser debido a que es el analito más polar de todos los estudiados y por lo tanto tuviera menor afinidad por este tipo de sorbente.

Se comprobó que la fase polimérica HLB no conseguía retenciones tan buenas como la fase reversa C₁₈ aunque fueron del orden del 90% para todos los casos. En el caso de 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona se consiguieron retenciones del 100%. Este hecho confirmaba la mayor afinidad de este analito por entornos más polares.

El caso de la fase híbrida se comprobó que la retención era menor que el 1% en todos los casos (no representado).

- *Estudios con suero*

Para este estudio, se utilizaron los cartuchos de fase reversa C₁₈, por ser los que mejor comportamiento habían mostrado en esta misma etapa durante el trabajo con disoluciones patrón.

Es importante determinar la máxima cantidad de muestra de partida que puede procesar el cartucho ya que la recuperación puede verse afectada por efectos de saturación con otros componentes de la matriz (Ismaiel y cols.,2008; Ismaiel y cols.,2010)

Los ensayos se hicieron tomando diferentes volúmenes de suero de partida: 50µL, 100µL, 200µL, 300µL y 500µL y cada uno de ellos se realizó por triplicado. El procedimiento de tratamiento de muestra que se siguió fue el detallado en el apartado 3.4. Todas las alícuotas se doparon con una disolución que contenía tres compuestos característicos de cada familia de compuestos estudiados. Un hidroxiesterol (27-hidroxicolesterol), un precursor (desmosterol) y un fitoesterol (sitosterol) de tal manera que quedaran a la concentración representativa que tienen en el suero. Esta concentración se muestra en la Tabla 1.6.

Los resultados se muestran en la Figura 1.4. Puede verse un comportamiento similar para cada familia de compuestos. En todos los casos, las mejores recuperaciones se obtuvieron cuando la cantidad de suero de partida era 500µL por este motivo fue la cantidad escogida.

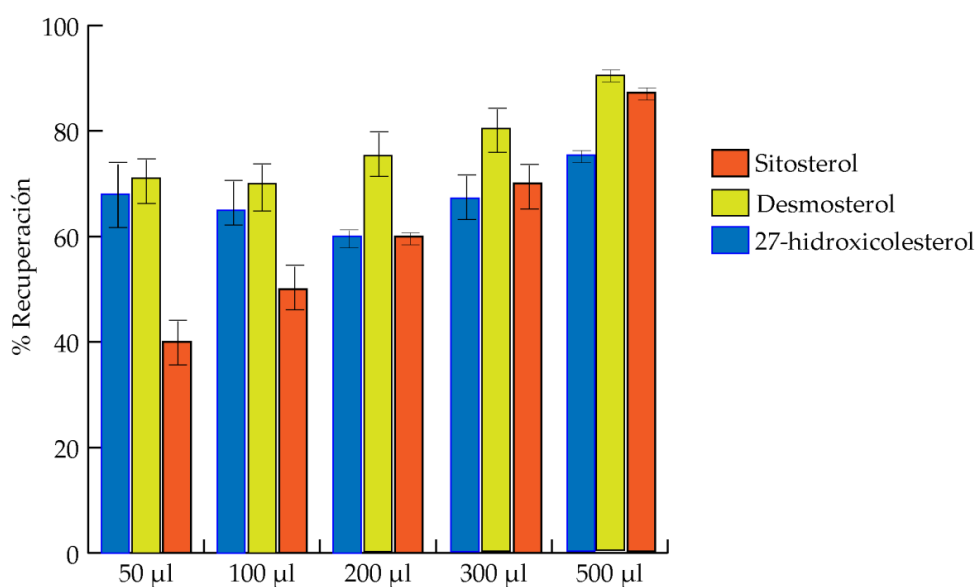


Figura 1.4 Estudio del volumen óptimo de suero de partida para el cartucho C₁₈

4.2.2-Etapa de lavado

- *Estudio con patrones*

Se llevó a cabo otro estudio experimental para determinar el tipo y volumen de disolvente a ser usado en esta etapa. La utilización de disolventes como el metanol o el agua o distintas proporciones de ambos habían dado resultados satisfactorios en otros estudios que determinaban esteroides utilizando la técnica de extracción en fase sólida (Kornel y cols.,2006; Mendiara y cols.,2012).

Se decidió probar diferentes disolventes de lavado, todos ellos fueron mezclas de metanol/agua. Estas mezclas fueron desde agua Milli-Q, metanol/agua Milli-Q (20:80, v/v), metanol/agua Milli-Q (40:60, v/v) y metanol/agua Milli-Q (80:20, v/v) y se ensayaron para comprobar la capacidad de los sorbentes para retener a los analitos en esta etapa.

Se trabajó con los cartuchos C_{18} y *HLB*. Los cartuchos de fase híbrida no fueron chequeados en esta etapa ya que su mecanismo de funcionamiento es diferente al de los otros dos. Como se explicó anteriormente, estos cartuchos están pensados para eliminar los fosfolípidos del suero y no para retener a los analitos.

Los cartuchos fueron acondicionados con 3mL de metanol/agua Milli-Q (5:95, v/v), ya que fue el disolvente que mejor resultado dio en la etapa de carga. Posteriormente, se cargaron 0,5mL de una disolución que contenía $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de todos los analitos en metanol.

A continuación se lavó cada sorbente con 5mL del disolvente de lavado. Se recogieron las fracciones a la salida del cartucho y se determinaron por *LC/MS*. Este procedimiento se repitió para ambos cartuchos, con cada una de las cuatro mezclas estudiadas.

Los mejores resultados se obtuvieron cuando los cartuchos se lavaron con 5mL de una mezcla metanol/agua Milli-Q (20:80, v/v) y se muestran en la Figura 1.5.

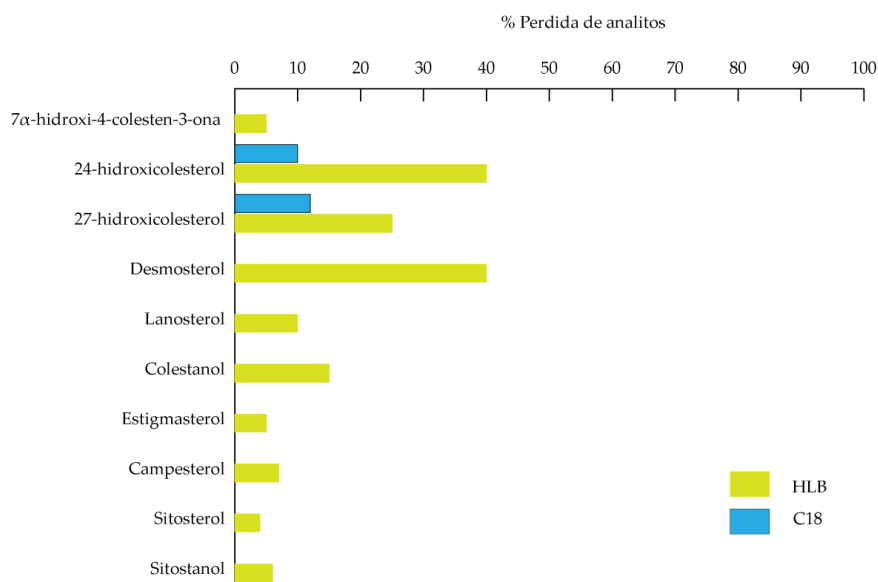


Figura 1.5. Porcentaje de analitos perdidos en la etapa de lavado usando diferentes sorbentes

Puede verse que para ambos sorbentes las mayores pérdidas de analitos se registraron para los hidroxiesteroles. Este hecho estaría directamente relacionado con la mayor polaridad de estos analitos respecto del resto, precursores de colesterol y fitoesteroles.

Los cartuchos *HLB* en esta etapa, mostraron pérdidas significativas de analitos que sumadas a las ya producidas en la etapa de carga no permitían seleccionar a este cartucho como el más adecuado para el trabajo.

El cartucho C_{18} había dado mejores resultados reteniendo a los analitos en ambas etapas, motivo por el cual se continuó el estudio con este tipo de sorbente.

- *Estudios con suero*

Una vez seleccionado el cartucho más adecuado, el disolvente de carga y el de lavado. Se determinó la cantidad de disolvente de lavado a utilizar con muestras de suero.

Se llevó a cabo el procedimiento experimental detallado en el apartado 3.4, al llegar a la etapa de lavado, se ensayaron tres volúmenes diferentes de metanol/agua Milli-Q (20:80, v/v) que fueron 1mL, 2mL y 5mL. Tras la elución, las alícuotas se determinaron por *LC/MS*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Del mismo modo que se hizo para la etapa de acondicionamiento, las muestras de suero se doparon con una disolución que contenía tres compuestos característicos de cada familia: un hidroxiesterol (27-hidroxicolesterol), un precursor (desmosterol) y un fitoesterol (sitosterol) de tal manera que quedaran a la concentración representativa que tienen en el suero, mostrada en Tabla 1.6.

Los resultados se muestran en la Figura 1.6. Puede verse que cuando se utilizan 5mL de metanol/agua Milli-Q (20:80, v/v) la relación área compuesto/área estándar interno obtenida es la menor de los tres casos, dando idea de una posible pérdida de analitos cuando se utilizan 5mL.

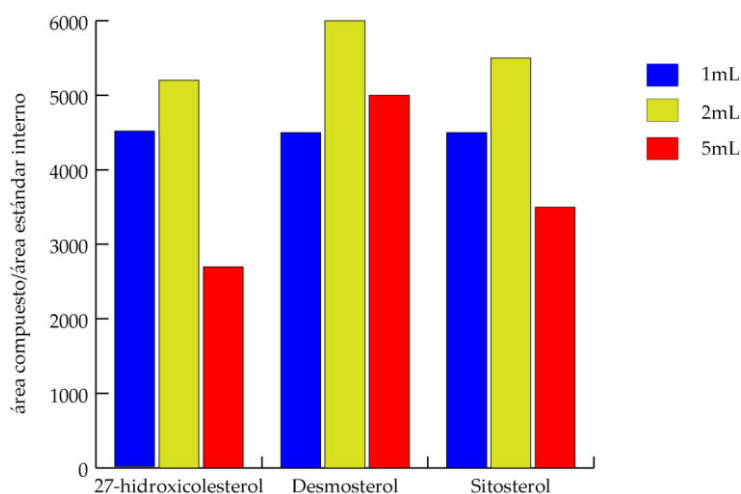


Figura 1.6. Estudio de la cantidad óptima de metanol/agua Milli-Q (20:80, v/v) a utilizar en la etapa de lavado con muestras de suero en sorbentes C₁₈

Este resultado confirmaba lo obtenido en el estudio con patrones para los hidroxiesteroides, pero no sucedía así para los precursores de colesterol y fitoesteroides ya que en los ensayos con patrones no se habían producido pérdidas utilizando 5mL de metanol/agua Milli-Q (20:80, v/v). Esto puede deberse a que el cartucho C₁₈ pierda capacidad de retención cuando se utiliza muestra real ya que el sorbente también puede saturarse de otros componentes de la muestra, provocando un detrimento en la capacidad de retención de los analitos (Ismaiel y cols.,2008; Ismaiel y cols.,2010).

Los resultados obtenidos también sugerían la cantidad de 2mL de metanol/agua Milli-Q (20:80, v/v) como la más adecuada. Para confirmar este resultado, se realizó una prueba adicional.

Una de las principales interferencias en el análisis de esteroides y por lo tanto uno de los principales componentes a eliminar son las proteínas. (McDonald y cols.,2007). Una de las características de los enlaces peptídicos es su capacidad de absorber en el ultravioleta lejano (180-230nm) (Devlin,2002).

Con el objetivo de confirmar que se estaban eliminando correctamente las interferencias, pese a utilizar menos volumen de lavado, se midió la absorbancia de ambas fracciones (2mL y 5mL) por espectrofotometría de absorción molecular a 220nm. Se tuvo en cuenta las diferentes diluciones de los extractos a la hora de realizar las medidas en el espectrofotómetro. Al no encontrarse diferencias significativas en la media de las absorbancias de ambos extractos (Abs=0,164 para 2mL y Abs=0,102 para 5mL). Se decidió utilizar 2mL de metanol/agua Milli-Q (20:80, v/v) como cantidad óptima para esta etapa.

4.2.3-Recuperación de los analitos

- *Estudio con patrones*

Para comenzar la optimización de esta etapa, se realizó un estudio preliminar con patrones y utilizando los cartuchos C₁₈. Se probaron dos disolventes diferentes de elución: metanol y 2-propanol.

Se partió de 0,5mL de una disolución que contenía $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada uno de los analitos en metanol y se continuó con el protocolo experimental. Al llegar a la etapa de elución fueron recogidos alícuotas de 0,5mL en 0,5mL hasta un total de 10mL y se determinaron por LC/MS. En este caso se observó que los analitos eluían con menos volumen usando 2-propanol mientras que se necesitaba una mayor cantidad de metanol para obtener el mismo resultado. El perfil de elución puede verse en la Figura 1.7.

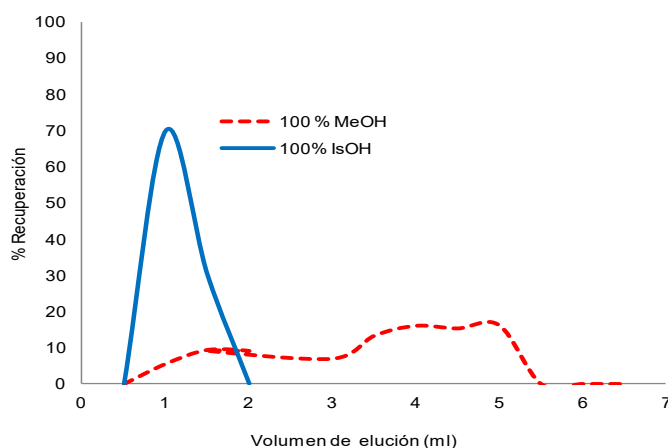


Figura 1.7. Estudio del tipo y volumen óptimo de disolvente en la etapa de elución para el cartucho C₁₈

- *Estudios con suero*

Una vez realizado el estudio con patrones, se comprobó si se necesitaba el mismo volumen de elución cuando se trabajaba con muestras de suero. Para lo cual, se llevó a cabo el protocolo experimental y tras recogidos los 1,5mL de la fracción de elución, se adicionaron otros 1,5mL de 2-propanol al cartucho y la fracción resultante se determinó por LC/MS.

Al no detectarse ningún compuesto, se confirmaron esos 1,5mL de 2-propanol como cantidad suficiente para esta etapa. Esta cantidad también fue la que se utilizó para los cartuchos de fase híbrida.

4.3- PARÁMETROS ANALÍTICOS

Una vez optimizados todos los pasos del método, se procedió al cálculo de los parámetros analíticos del mismo. Se determinó la curva de calibrado, el rango lineal y los límites de detección y cuantificación. Los resultados se resumen en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Características analíticas del método

Compuesto	Tiempo retención (min)	Coefficiente (R ²)	Intervalo lineal (µg·mL ⁻¹)	LOD (ng·mL ⁻¹)	LOQ (ng·mL ⁻¹)
7α-hidroxi-4-colesten-3-ona	4,0	0,999	0,008-0,474	2	8
24-hidroxicolesterol	7,4	0,995	0,038-0,494	12	38
27-hidroxicolesterol	8,7	0,996	0,140-0,512	42	140
Desmosterol	14,2	0,997	0,221-5,02	66	221
Lanosterol	15,5	0,999	0,025-10,0	8	25
Colestanol	16,5	0,997	0,274-10,1	82	274
Estigmasterol	16,3	0,999	0,057-3,90	17	57
Campesterol	16,4	0,999	0,009-10,1	3	9
Sitosterol	16,9	0,999	0,103-19,9	31	103
Sitostanol	17,8	0,996	0,227-3,83	68	227

Las curvas de calibrado para todos los analitos resultaron ser lineales en dos órdenes de magnitud para la mayoría de los analitos, lanosterol y campesterol lo fueron en tres órdenes de magnitud. Sin embargo 24-hidroxicolesterol, desmosterol y sitostanol lo fueron en un orden de magnitud. Los coeficientes de regresión oscilaron entre 0,995 para 24-hidroxicolesterol y 0,999 para la mayoría de los compuestos estudiados.

Los límites de detección estuvieron en el rango de los $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ siendo 2 el menor para 7α -hidroxi-4-colesten-3-ona y 82 el más alto para el colestanol. Los límites de cuantificación fueron $8\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 7α -hidroxi-4-colesten-3-ona y $274\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el colestanol.

Utilizando cartuchos C_{18} , se determinó la recuperación, la exactitud, la repetibilidad y la precisión intermedia. Las recuperaciones ($n=3$) estuvieron comprendidas entre el 85% para 7α -hidroxi-4-colesten-3-ona y 99% para desmosterol, campesterol y sitosterol. Sólomente 27-hidroxicolesterol tuvo una recuperación inferior al 80% (75%) hecho que puede estar relacionado con el carácter más polar de los hidroxiesteros. La exactitud ($n=5$) fue en todos los casos mayor del 92%. La repetibilidad ($n=6$) fue del 15% en valor promedio para todos los analitos. La precisión intermedia osciló entre el 7% para lanosterol y 20% para 27-hidroxicolesterol. Todos estos valores se muestran en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Exactitud, repetibilidad y precisión intermedia obtenidos con cartuchos C_{18}

Compuesto	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ añadidos	Exactitud (%)	Recuperación (%)	Repetibilidad (%)	Precisión intermedia (%)
7α-hidroxi-4-colesten-3-ona	0,10	95	85 ± 4	9	8
24-hidroxicolesterol	0,17	93	93 ± 5	12	15
27-hidroxicolesterol	0,15	92	75 ± 7	16	20
Desmosterol	10,2	99	90 ± 4	10	9
Lanosterol	1,45	98	99 ± 2	4	7
Colestanol	0,67	98	99 ± 3	18	8
Estigmasterol	1,89	98	92 ± 3	18	10
Campesterol	4,26	99	94 ± 1	10	8
Sitosterol	15,8	99	87 ± 1	13	19
Sitostanol	0,30	95	96 ± 2	9	9

También se determinaron los mismos parámetros analíticos para los cartuchos de fase híbrida. Los valores de recuperación ($n=3$) oscilaron entre el 21% para sitosterol y 94% para estigmasterol. La exactitud ($n=5$) fue en todos los casos mayor del 94% para todos los analitos. Los valores de repetibilidad ($n=6$) estuvieron comprendidos entre 4% para colestanol y 23% para desmosterol. La precisión intermedia osciló entre el 11% para 27-hidroxicolesterol y 22% para el colestanol. Los resultados se muestran en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Exactitud, repetibilidad y precisión intermedia obtenidos con cartuchos de fase híbrida

Compuesto	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ añadidos	Exactitud (%)	Recupera- ción (%)	Repeti- bilidad (%)	Precisión intermedia (%)
7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona	0,10	98	90 \pm 2	9	16
24-hidroxicolesterol	0,17	99	92 \pm 2	14	20
27-hidroxicolesterol	0,15	94	92 \pm 3	7	11
Desmosterol	10,2	96	28 \pm 8	23	13
Lanosterol	1,45	95	61 \pm 7	13	20
Colestanol	0,67	97	65 \pm 3	4	22
Estigmasterol	1,89	98	94 \pm 8	13	16
Campesterol	4,26	99	66 \pm 8	14	12
Sitosterol	15,8	97	21 \pm 4	20	12
Sitostanol	0,30	95	65 \pm 8	16	13

Tras la determinación de las características analíticas de ambos cartuchos, se observó que los cartuchos C_{18} mostraron mejor comportamiento para mayor número analitos que los cartuchos de fase híbrida. Sin embargo, estos últimos dieron mejores resultados para la determinación de los hidroxiesteros que los C_{18} . Siendo así, podría proponerse la utilización de la fase híbrida para la retención de interferencias, previa carga de la muestra en el sorbente C_{18} , como complemento al proceso de extracción en fase sólida.

4.4- DETERMINACIÓN LA CANTIDAD DE ESTEROLES LIBRES Y TOTALES

Conocer la cantidad libre y total de esteroides en el suero y la relación entre ambas es importante en el estudio de la homeostasis del colesterol (Thompson,2004). Finalmente, se determinó la cantidad total de esteroides en el pool de suero. Para determinar la cantidad libre de estos analitos en el suero bastó omitir la etapa de hidrólisis alcalina. La cantidad esterificada puede obtenerse restando la cantidad libre de la total. Los resultados se muestran en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6. Valores de esteroides libres y totales obtenidos con cartuchos C₁₈

Compuesto	Valores referencia suero($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[Total] ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[Libre] ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[Esterificado] ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona	0,015-0,080	0,013 \pm 0,002	0,006 \pm 0,001	<LOQ
24-hidroxicolesterol	0,022-0,133	< LOD	<LOD	<LOD
27-hidroxicolesterol	0,067-0,330	0,12 \pm 0,01	< LOQ	<LOQ
Desmosterol	0,490-20,0	1,11 \pm 0,08	<LOQ	0,95 \pm 0,09
Lanosterol	0,110-3,21	0,91 \pm 0,04	0,10 \pm 0,02	0,81 \pm 0,04
Colestanol	0,120-1,16	3,60 \pm 0,09	1,91 \pm 0,05	1,69 \pm 0,10
Estigmasterol	1,600-2,62	1,30 \pm 0,33	0,38 \pm 0,09	0,92 \pm 0,34
Campesterol	2,49-7,64	4,10 \pm 0,37	1,51 \pm 0,18	2,59 \pm 0,41
Sitosterol	2,27-30,8	2,36 \pm 0,39	0,86 \pm 0,18	1,50 \pm 0,43
Sitostanol	0,250-12,5	1,16 \pm 0,05	0,64 \pm 0,03	0,52 \pm 0,06

La cantidad libre y total de 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona, marcador de la tasa de degradación de colesterol a nivel hepático, no fue significativamente diferente del encontrado en bibliografía (Honda y cols.,2007; Lövgren-Sandblom y cols.,2007). Los valores encontrados para la concentración total de 27-hidroxicolesterol estuvieron en el mismo rango encontrado en bibliografía al determinar este analito mediante LC/MS (Burkard y cols.,2004). Los valores

encontrados para 24-hidroxicolesterol se encontraron en todos los casos por debajo del límite de detección.

En el caso de los precursores hay que destacar el caso del lanosterol, un analito ampliamente analizado y utilizado como marcador de la síntesis del colesterol (Miettinen y cols.,2011). Este analito no se pudo determinar en este trabajo por ser interferencia isobárica del colesterol (McDonald y cols.,2007). Los valores de lanosterol libre y desmosterol total fueron similares a los obtenidos respectivamente por Lund y Nikkila (Lund y cols.,1990; Nikkila y cols.,1992).

Para el caso del colestanol, se encontraron métodos publicados utilizando cromatografía de líquidos con detector ultravioleta cuyos valores eran parecidos a los obtenidos con este método (Halperin y cols.,2000).

Los valores de los fitoesteroles encontrados en el pool de suero analizado estuvieron en el mismo rango que los encontrados por otros autores que también utilizaron *LC/MS* en su determinación (Lembcke y cols.,2005).

5-CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas a lo largo de este capítulo se resumen a continuación:

- I. El uso de un baño de ultrasonidos facilitó la reacción de hidrólisis favoreciendo la conversión de las formas totales en las libres, lo que suponía una simplificación del tratamiento de muestra.
- II. La fase C₁₈ es la más adecuada para el trabajo con las diferentes familias de esteroides. La fase híbrida podría utilizarse como complemento al proceso de extracción en fase sólida para la retención de interferencias, previa carga de la muestra en el sorbente C₁₈.
- III. Los valores obtenidos para esteroides libres y totales en muestras de suero mediante *LC/MS* están de acuerdo a los encontrados en bibliografía utilizando otros métodos analíticos.

CAPÍTULO 2: DESARROLLO DE UN MÉTODO ONLINE *RAM-LC-MS* PARA LA DETERMINACIÓN DE PRECURSORES DE COLESTEROL Y FITOESTEROLES EN SUERO HUMANO

1-INTRODUCCIÓN

Los procesos de tratamiento de muestra para el análisis de esteroides comparten una característica común y es que suelen realizarse en un lugar distinto a donde tiene lugar la separación cromatográfica y la detección. Esta es una de las razones por las que en los últimos años, los esfuerzos se orientan al desarrollo de métodos de tratamiento de muestra más automatizados.

Estos sistemas reciben el nombre de sistemas online de tratamiento de muestra. Todo esto se consigue gracias al desarrollo de nuevos materiales que posibilitan su integración en el sistema cromatográfico. Este es el caso de los materiales de acceso restringido o restricted access material (*RAM*), empleados para el trabajo desarrollado en este capítulo.

El término *RAM* fue introducido por Desilets en 1991 (Desilets y cols.,1991), pero el primer ejemplo de adsorbente fue utilizado en 1986 por Pinkerton (Cook y cols.,1986) bajo el nombre de *ISRP* (Internal Surface Reversed-Phase). En cualquier caso, este tipo de sorbentes representan una clase especial de material que es capaz de fraccionar la muestra biológica en dos partes: una de ellas contiene las macromoléculas (las proteínas en el caso del suero) y otra fracción que contiene las moléculas de menor tamaño (los analitos a determinar en este caso) (Mullett y cols.,2001).

Los cartuchos *RAM* se clasifican de acuerdo con el mecanismo de exclusión macromolecular que utiliza. Esta exclusión puede ser debida a una barrera física por el diámetro de poro, o por una barrera química creada por una proteína (o polímero) de red en la superficie de la partícula, por la que sólo pueden difundir las moléculas pequeñas (Boos y cols.,1997). Esta clasificación se completa subdividiendo los adsorbentes con respecto a su superficie química. Algunos autores distinguen entre fase bimodal, en la que tanto la cara externa como la interna tiene diferentes tipos de enlace, y fase unimodal, en la que hay un tipo de enlace en ambas caras (Souverain y cols.,2004).

El cartucho *RAM*, fue presentado por Hermansson y Grahm en 1994 (Hermansson y cols.,1994) y comercializado bajo el nombre de *BioTrap*. Se caracteriza por tener un mecanismo de exclusión de barrera química. En concreto el cartucho está hecho de sílice porosa recubierta por una proteína llamada α -glicoproteína (AGP), muy estable, que tolera los disolventes orgánicos utilizados en cromatografía de líquidos. Además, permite la inyección directa de fluidos biológicos en el sistema con muy poco tratamiento previo, aunque resulta recomendable eliminar previamente las macromoléculas presentes en la muestra, que puedan obstruir el cartucho y dañarlo.

El funcionamiento se caracteriza por permitir la entrada de pequeñas moléculas dentro de los poros. Los grupos hidrófobos (C_8 o C_{18}) que se encuentran en la superficie interior son los responsables de la interacción con los analitos, mientras que las macromoléculas son excluidas y sólo interactúan con la superficie exterior ya que no pueden penetrar en los poros cuyo tamaño es de unos 10nm (Hosoya y cols.,1994).

Es importante destacar la larga vida útil que tienen este tipo de cartuchos ya que permiten realizar más de 300 inyecciones de suero tratado sin que se vean mermadas las características analíticas del método. Un esquema de este tipo de material se representa en la Figura 2.1

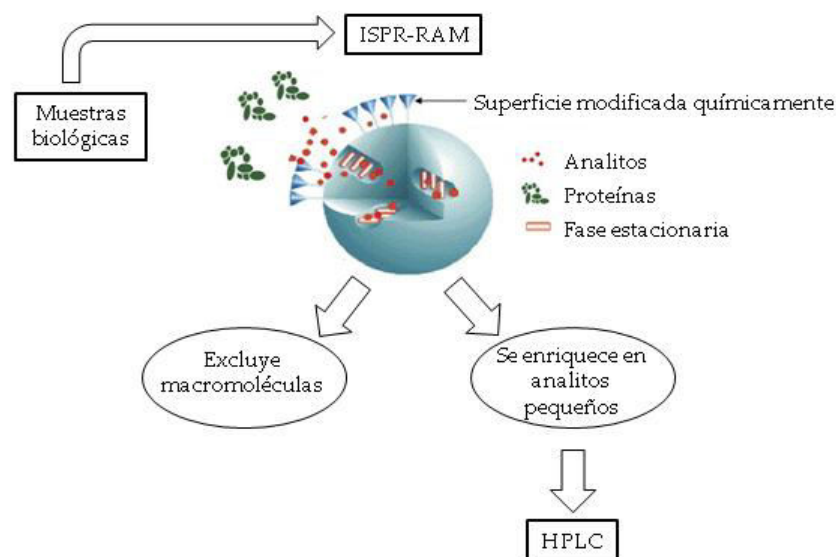


Figura 2.1. Esquema de la composición y funcionamiento del RAM

Han sido muchos los analitos procedentes de matrices biológicas determinados mediante el uso de sistemas online. La mayoría de estos métodos se centran en el análisis de drogas tanto en suero, plasma u orina y en menor medida en analitos endógenos. Los analitos endógenos más determinados con estos métodos son las hormonas, tanto en suero, plasma y orina (Souverain y cols.,2004). En el caso de compuestos relacionados con el metabolismo del colesterol, existen métodos online para la determinación de ácidos biliares en suero (Bentayeb y cols.,2008), pero no se ha encontrado bibliografía para el caso de los precursores de colesterol y fitoesteroides.

2-OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo es desarrollar un sistema online *RAM-LC-MS* que permita automatizar el tratamiento de muestra para el análisis de precursores de colesterol y fitoesteroles en suero humano.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar un sistema que permita integrar el cartucho *RAM* con el cromatógrafo de líquidos para trabajar de forma sincronizada.
- Compatibilizar el uso de dos fases reversas en el mismo sistema.
- Determinar la concentración de precursores de colesterol y fitoesteroles libres en muestras de suero humano y compararlo con los obtenidos por otros métodos.

3-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1-MATERIALES Y REACTIVOS

Los estándares utilizados fueron desmosterol (85%, número CAS: 303-04-2), lanosterol (97%, 79-63-0), campesterol (65%, 474-62-4), estigmasterol (95%, 83-48-7), sitosterol (95%, 83-46-5), y colesterol 26,26,26,27,27,27-(d6) (estándar interno, 97%, 60816-17-3). Los disolventes utilizados fueron metanol (calidad analítica para LC-MS, 67-56-1), 2-propanol (LC-MS grade, 67-63-0), tolueno (calidad analítica para GC, 108-88-3) Sharlab (Barcelona, España). El agua se suministraba por un equipo Milli-Q Plus 186 de Millipore (Billerica, MS, EEUU).

Todas las disoluciones necesarias tanto para la optimización como para la cuantificación se prepararon a partir de disoluciones patrón conteniendo los compuestos aproximadamente $1000\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol. El estándar interno se preparó en 2-propanol a una concentración de $100\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Se prepararon disoluciones de trabajo que contenían a cada uno de los esteroides estudiados a una concentración de $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Las disoluciones fueron conservadas a -20°C .

3.2-INSTRUMENTOS

Se utilizó una balanza analítica GR-202-EC A&D Instruments LTD (Tokio, Japón); Vórtex Velp Scientifica Instruments 50-60 Hz (Usmate, MB, Italia); una centrifuga Microfuge® 18 Centrifuge, Beckman

Coulter™ (Brea, CA, USA) y un baño de Ultrasonidos Branson 3510 MTH (Fredericksburg, Virginia, USA).

3.3-POOL DE SUERO

El pool de suero fue obtenido tras la mezcla del suero individual de 200 pacientes. Fue administrado por la Unidad de Lípidos del Hospital Miguel Servet de Zaragoza y fue conservado en oscuridad a -80°C hasta su análisis. Todos los pacientes fueron informados y dieron su consentimiento por escrito al protocolo aprobado por un comité de ética médica (Comité ético de Investigación Clínica de Aragón ECRR/00034, España).

3.4-MONTAJE EXPERIMENTAL DEL SISTEMA ONLINE

3.4.1-Conexiones

El sistema online está formado por seis equipos independientes: la bomba 1 se encarga de suministrar el flujo al *RAM*, un inyector, la bomba 2 necesaria que suministra el flujo auxiliar que introduce los analitos en la columna, la bomba 3 que suministra el flujo a la columna, un espectrómetro de masas y una válvula de diez vías conectada a un controlador eléctrico cuyos cambios de señal determinan la duración de las etapas del proceso. La Figura 2.2 muestra un esquema de los paneles traseros de cada uno de los equipos y de las conexiones realizadas entre ellos. Todas las conexiones se realizaron mediante cables que transmitían señales analógicas.

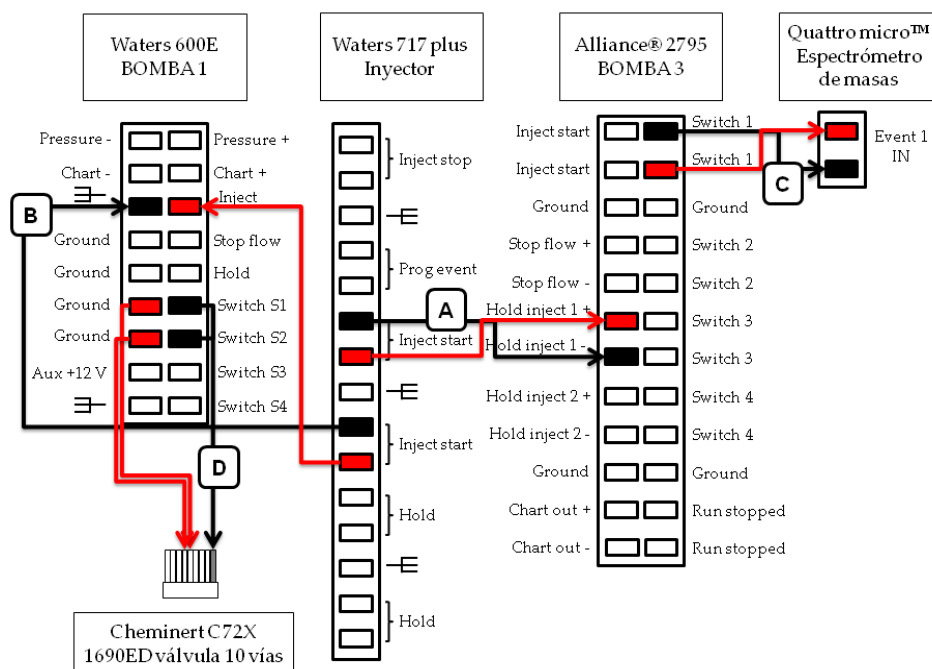


Figura 2.2 Conexiones entre los diferentes equipos en el sistema online

La conexión A une el terminal “Inject Start” del inyector con el terminal “Hold Inject” de la bomba 3. La conexión B se encarga de unir el terminal secundario “Inject Start” del inyector con los terminales “Ground-Inject” de la bomba 1. La conexión C pone en comunicación el terminal “Switch 1” de la bomba 3 con el terminal “Event 1 IN” del espectrómetro. La conexión D une los terminales “Switch 1” and “Switch 2” de la bomba 1 con el “ground-5th” and “ground-6th” que son los terminales correspondientes del controlador eléctrico. El “Switch 1” es el encargado de recibir la señal que cambia la válvula desde la posición A a la posición B y el “Switch 2” es el encargado de la acción contraria, cambiar la válvula de la posición B a la posición A. Como se

explicará posteriormente, esta válvula juega un papel fundamental ya que su cambio de posición determina las etapas del proceso y el sentido que sigue el caudal en el sistema.

El software encargado de la adquisición de los datos (MassLynx) se configuró para que solamente tuviera control sobre el espectrómetro de masas, desactivando cualquier acción sobre el inyector. Esta acción fue necesaria porque el inyector del sistema online no podía controlarse con el software. Había que programarlo manualmente al inicio de una secuencia de muestras.

En la Figura 2.3 se presenta un esquema de las etapas que comprenden el método. Todas ellas tienen lugar cuando la válvula se encuentra en posición A, salvo la etapa de elución que tiene lugar cuando la válvula se encuentra en posición B.

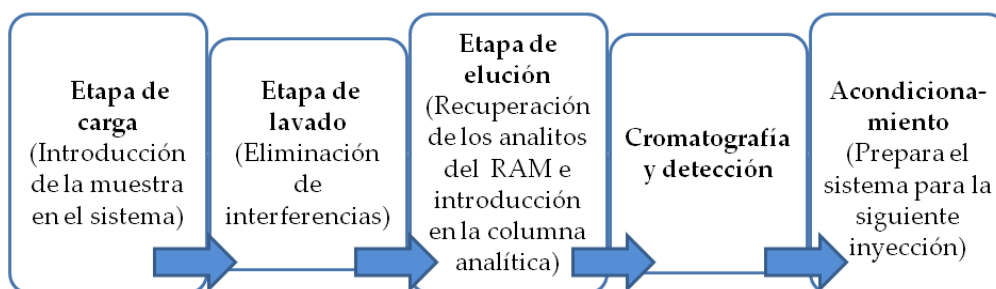


Figura 2.3. Esquema de las etapas en de las que se compone el método

La Figura 2.4 ilustra el montaje y el funcionamiento del sistema online. El proceso se inicia en el inyector, puede verse la parte implicada en cada etapa en líneas punteadas, las flechas indican el sentido del caudal.

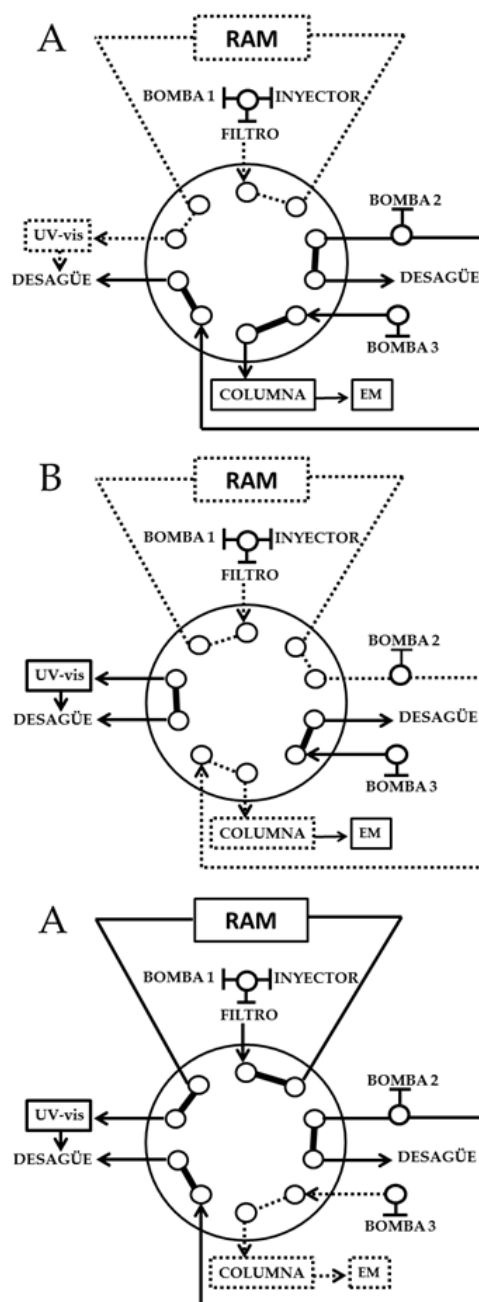


Figura 2.4. Diagrama de flujo del sistema online RAM-LC-MS. Posición A: Etapas de carga
Posición B: Elución, Posición A: detección.. El camino del flujo comienza en el inyector y se representa en línea punteada

Como puede verse en la Figura 2.4. Las fases móviles se administraron por tres bombas. Al cartucho RAM (20x4 mm BioTrap 500 C18 de ChromTech Ltd (Cheshire, UK), le suministró caudal la bomba 600E Controller Multisolvent Delivery System (bomba 1) acoplada a un inyector 717 plus Autosampler (Waters, Milford, MS, USA), (inyector). La segunda fue la bomba Kontron 322 System (Kontron Instruments, Neufahrn, Germany) (bomba 2), que actuó como bomba auxiliar. Por último, el Alliance® 2795 (Waters) (bomba 3), fue el encargado de la cromatografía. Los tiempos de cada etapa y la dirección del caudal de los disolventes fueron gobernados por una válvula de diez vías Cheminert C72X 1690ED controlada por un actuador microeléctrico VICI® Valco Instruments (Houston, TX, USA). Finalmente, los analitos fueron detectados utilizando un espectrómetro de Quattro micro™ API (Waters) (espectrómetro). Para cada etapa se ha diseñado un gradiente cromatográfico cuyas características se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Gradiente y condiciones utilizadas en el cartucho RAM

BOMBA 1 (Flujo a través del cartucho RAM)						
Etapas	Tiempo (min)	Posición de la válvula	Caudal (mL/min)	Metanol Agua(3/2) (%)	Agua (%)	2-Propanol (%)
Carga	0	A	2.0	100	0	0
Lavado	4		2.0	0	100	0
Elución	9	B	0.4	0	0	100
Detección	35	A	0.5	0	0	100
	44		0.4	100	0	0
	49		0.4	100	0	0

El diseño experimental de cada etapa y su funcionamiento se detalla a continuación.

3.4.2-Etapa de carga

El inyector 717 plus Autosampler se encargó de introducir 300µL de muestra en el sistema online. La fase móvil inicial fue metanol/agua Milli-Q (60:40, v/v a un caudal de 2mL/min). La muestra llegó al cartucho *RAM* previo paso por un filtro de 2µm. La duración de esta etapa fue de 4 minutos.

3.4.3-Etapa de lavado

La etapa de lavado comenzó una vez introducida la muestra en el sistema y tras su llegada al cartucho *RAM*. Para esta etapa se utilizó un caudal de 2mL/min de agua Milli-Q durante 1 minuto. En esta etapa, los compuestos que no fueron retenidos en la fase C_{18} , principalmente proteínas del suero, fueron eliminados. Esta eliminación se confirmó gracias a la presencia de un detector de absorbancia dual λ 2487 (Waters) situado a la salida del *RAM*. La detección se realizó a 220nm. La eliminación se consideró completa cuando la señal disminuye por debajo de 0,05 unidades de absorbancia. Entonces, la válvula cambió automáticamente a la posición B, y comenzó la etapa de elución.

3.4.4-Equilibrado del sistema

Cuando la válvula cambia de posición A posición B, el caudal que entra en la columna aumenta de 0,3 a 1mL/min. Para evitar cambios bruscos de presión en el sistema, este caudal se va aumentando lentamente durante el minuto anterior al cambio de posición de la válvula. Este mismo paso se tiene

en cuenta cuando la válvula vuelve a cambiar de posición B a A. De este modo desde el minuto 31 a 35 el caudal aumentó de 0,3mL/min a 0,7mL/min.

3.4.5-Elución

Desde el minuto 9 al 35 los compuestos retenidos fueron eluidos del RAM. En la etapa de elución se utilizó 2-propanol a un caudal 0,4mL/min. Esta etapa se realiza en modo *backflush*. Este término se refiere al sentido que sigue el caudal en el sistema indicando que es opuesto al que ha se había seguido hasta ahora. Este caudal se mezcló a la salida del RAM con 0,6mL/min de agua Milli-Q, antes de llegar a la columna, dando un caudal total de 1 mL/min, cuya composición fue 2-propanol/agua Milli-Q (40:60, v/v). Esta composición aseguraba la retención de los esteroides en la cabeza de la columna.

3.4.6-Detección

El gradiente cromatográfico comenzó en el minuto 35. El último compuesto (sitosterol) se eluyó en el minuto 49 min. El gradiente utilizado se muestra en la Tabla 2.2. Los parámetros instrumentales empleados en la detección, así como los valores de m/z y tiempo de retención, se muestran en la Tabla 2.3. El software MassLynx v.4.1 de Waters se utilizó para adquirir y procesar los datos.

Tabla 2.2. Gradiente y condiciones utilizadas en la columna analítica

BOMBA 3 (Flujo a través de la columna analítica)					
Etapa	Tiempo (min)	Posición de la válvula	Caudal (mL/min)	Metanol (%)	Agua(%)
Carga	0.0	A	0.3	100*	0
Lavado	4		0.3	100	0
Elución	9	B	0.3	0	100
Detección	35	A	0.7	85	15
	44		0.7	100	0
	49		0.3	100	0

Tabla 2.3. Condiciones para la detección de los analitos en el sistema online

Columna	X-Terra® MS C18 100 mm x 4,6 mm x 3,5 µm				
Temperatura de la columna	60°C				
Interfase	APCI				
Modo de detección	SIR				
Ionización	positivo				
Voltaje de corona	10µA				
Temperatura de desolvatación	600°C				
Caudal de gas de desolvatación	600L/h				
Caudal de gas de cono	40L/h				
Temperatura fuente	130 °C				
Compuesto	Peso molecular	m/z	Mecanismo	Vcono	tr (min)
Desmosterol	384,6	367,5	[M+H-H ₂ O] ⁺	20	46,2
Lanosterol	426,4	409,5	[M+H-H ₂ O] ⁺	20	47,9
Estigmasterol	412,7	395,5	[M+H-H ₂ O] ⁺	20	48,0
Campesterol	400,6	383,5	[M+H-H ₂ O] ⁺	20	48,1
Sitosterol	414,7	397,6	[M+H-H ₂ O] ⁺	20	48,9
Colesterol-d6	392,6	375,5	[M+H-H ₂ O] ⁺	20	48,1

3.4.7-Acondicionamiento del sistema

En el minuto 35, la válvula cambió de la posición B a la A de nuevo, con la finalidad de limpiar el cartucho RAM de compuestos remanentes de la inyección anterior. Para ello, se pasaron 5mL de 2-propanol a través del cartucho RAM. Después del minuto 44, la composición de la fase móvil cambió de nuevo a la fase móvil inicial 60% de metanol y 40% de agua Milli-Q, con la finalidad de equilibrar el sistema para la siguiente inyección.

Al finalizar la separación cromatográfica en la columna, ésta se acondicionó durante 5 minutos con 2-propanol a 0,3mL/min. Del mismo modo, al principio del proceso, mientras la muestra se introducía en el cartucho *RAM*, la columna se acondicionó con 100% metanol. En ambos casos, y para evitar introducir este caudal al espectrómetro, la válvula auxiliar a la entrada del espectrómetro de masas cambió de posición y el caudal se condujo al residuo en vez de al detector. En la Figura 2.5 puede verse una fotografía del sistema online.



Figura 2.5-Fotografía del sistema online con el que se ha trabajado.

3.5-TRATAMIENTO DE MUESTRA

Se basó en una modificación del método Bligh/Dyer (Bligh y cols.,1959). Se partió de 300μL de suero y se añadió 1mL de una mezcla de cloroformo–metanol (1:2, v/v) que contenía 30μL de la disolución de 100μg·g⁻¹ de estándar

interno. La mezcla se agitó en el vórtex durante unos segundos y posteriormente se añadieron 350 μ L de cloroformo y 350 μ L de metanol. Toda la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 9000rpm y se recuperó la fase orgánica inferior con la ayuda de una pipeta Pasteur. El extracto se pesó, previo trasvase a vial de vidrio de 2mL, y se le añadió 1mL de metanol. De esta manera, la muestra quedó lista para ser inyectada en el sistema online.

3.6-PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO

3.6.1-Curva de calibrado y rango lineal

Se prepararon disoluciones con concentraciones que fueron desde 20ng·g⁻¹ hasta 2 μ g·g⁻¹. Todas ellas contenían 30 μ L de la disolución de 100 μ g·g⁻¹ de estándar interno. Las disoluciones para la determinación de la curva de calibrado se prepararon en una mezcla de cloroformo–metanol (1:2, v/v). Esta composición coincide con la composición que queda en el extracto final. Las disoluciones preparadas se inyectaron de forma aleatoria por triplicado. El rango lineal se determinó con 6 puntos de calibración, cada uno por triplicado.

3.6.2-Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir del ruido observado en las líneas base de los cromatogramas correspondientes, como tres y diez veces la desviación estándar del blanco, respectivamente.

3.6.3-Precisión: Repetibilidad y precisión intermedia

La repetibilidad de ambos procedimientos se obtuvo ejecutando el método el mismo día, partiendo de un pool de suero preparado para 6 muestras (n=6) dopado a dos niveles diferentes de concentración: a la mitad de la concentración encontrada en el suero y a la décima parte. Esta concentración se muestra en la Tabla 2.4 del apartado 4.8. La precisión intermedia se determinó realizando el mismo procedimiento también a los dos niveles de concentración durante tres días (n=3).

3.6.4-Exactitud

Se realizó con muestras dopadas, muestras sin dopar y muestras sin matriz. Se prepararon tres muestras tipo A, tres muestras tipo C y tres muestras tipo D del mismo modo que el explicado en el subapartado anterior. La ecuación que se utilizó para calcular la exactitud fue:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Valor interpolado} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \quad (1)$$

3.6.5-Recuperación y selectividad

El estudio de recuperación y selectividad del método se realizó con pool de suero. Se siguió el protocolo propuesto por Trufelli (Trufelli y cols.,2011). Como se comentó en la introducción, este protocolo propone analizar varios conjuntos de muestras que se pasan a explicar con mayor detalle a continuación.

- *Las muestras A*

Se componen de una disolución estándar con una concentración conocida de los analitos. En la Tabla 2.4 se muestran las concentraciones finales en los viales tras dopar la muestra y corresponden a la mitad y a la décima parte de la concentración de estos analitos en el suero.

Tabla 2.4 Concentración dopada en las muestras					
(ng/mL)	DSM	LAN	STG	CMP	STE
Nivel mitad	221	40	405	745	442
Nivel décimo	45	8.5	87	160	96

- *Las muestras B*

Son muestras sometidas a todo el tratamiento de muestra y dopadas al final del mismo. El ensayo se realizó con suero para tres muestras (n=3) para cada nivel de concentración. El protocolo seguido se ha descrito en el apartado 3.5. Las muestras se doparon al final del protocolo.

- *Las muestras C*

Son muestras que se doparon con una cantidad conocida de analitos al principio del tratamiento de muestra. El protocolo seguido está descrito en el apartado 3.5. El ensayo se realizó con suero para tres muestras (n=3) para cada nivel de concentración.

- *Las muestras D*

Se prepararon tal como se describió en el apartado 3.5. Utilizando muestras de suero sin dopar. Estas muestras se prepararon por triplicado y sirvieron para tener en cuenta la concentración endógena de analitos de la matriz de trabajo. De este modo, las ecuaciones resultantes que se utilizaron para el cálculo de la recuperación y selectividad son:

$$\text{Efecto matriz (\%)} = \frac{B-D}{A} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{C-D}{B-D} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Eficacia del proceso (\%)} = \frac{C-D}{A} \times 100 \quad (4)$$

4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 –SINCRONIZACIÓN DEL SISTEMA ONLINE

Hay que destacar la importancia que tiene que todos los equipos trabajen de forma sincronizada, ya que cualquier señal errónea puede provocar inyecciones defectuosas y pérdidas de muestra, bien por una mala cromatografía o por no respetar los tiempos de cada etapa del proceso.

El tiempo de cada inyección lo marca el inyector. El sistema no se descomparará mientras el resto de los equipos mantengan tiempos de inicio de gradiente mayores que el del inyector. Esto resulta de utilidad en la última inyección de la secuencia, ya que programando los gradientes de la bomba 1 y 3 disminuirán su caudal hasta pararse cuando el sistema online termine la secuencia.

El protocolo para una secuencia de muestras es el siguiente: primero se completa la lista de muestras en el software y se da la orden de inicio, el estado de la adquisición cambia de “Standby” a “Waiting for injection”. Tras esto, se prepara la secuencia en el inyector, donde se indica el volumen de muestra a introducir, número de muestras a procesar y el tiempo entre cada inyección. Seguidamente, se le da la orden de inicio. El inyector envía una señal de inicio a la bomba 1 y a la bomba 3 que a su vez enviará señal de adquisición al espectrómetro de masas. Es importante que la bomba 3 se configure en modo “Operate Gradient by Event In”.

De esta manera se asegura que la bomba 3 sólo comience su gradiente cuando reciba la señal del inyector. Finalmente, la bomba 2 opera separadamente proporcionando un caudal constante de agua de 0.6mL/min a lo largo de toda la secuencia.

4.2 –TRATAMIENTO DE MUESTRA

4.2.1-Interacciones analito-lipoproteína

Los esteroides son transportados en el suero a través de unos ensamblados macromoleculares llamados lipoproteínas (McDonald y cols.,2012). El tamaño de las lipoproteínas supera el tamaño de diámetro de los poros del RAM (10nm) (Hosoya y cols.,1994), siendo en algunos casos hasta 10 veces superior (Colhoun y cols.,2002). Debido a esto las lipoproteínas serían descartadas y eliminadas del sistema en la primera etapa. Los esteroides también serían eliminados, ya que al no poder entrar en los poros del RAM no podrían interaccionar con su fase estacionaria, que es dónde quedan retenidos. Por este motivo, es necesario romper la unión que existe entre el analito y la lipoproteína. Existen estudios de análisis directos de drogas en suero que demuestran que la adición entre un 5-50% de metanol al plasma es suficiente para romper esta interacción droga-proteína (Ho y cols.,2002). Estos métodos consiguen una efectiva eliminación de las proteínas, además de recuperaciones del analito superiores al 80% (Pedersen-Bjergaard y cols.,2005).

Los esteroides no interaccionan solamente con las lipoproteínas sino que, además, están empaquetados en ellas (McDonald y cols.,2012). Por esto, la

simple adición de metanol no es suficiente para conseguir buenas recuperaciones. Esto supone una diferencia respecto de los análisis de drogas en suero, ya que muchas de ellas si consiguen mantenerse solubles en metanol.

Durante el desarrollo del método se realizaron estudios de recuperación llevando a cabo dos tratamientos de muestra diferentes: una precipitación de proteínas con metanol y una extracción Bligh/Dyer. Como finalmente se verá, para conseguir precipitar las proteínas y solubilizar los esteroides en un solo paso se pensó en realizar una extracción Bligh/Dyer.

En el caso de la precipitación de proteínas, se añadieron 1,4mL de metanol a 0,5mL de suero, la mezcla se introdujo en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 9000 rpm durante 20 minutos y finalmente, se recuperó el sobrenadante que fue filtrado con un filtro de nylon de 0,22 μ m. Se chequearon las pérdidas mediante muestras dopadas para ello se realizaron ensayos por triplicado de muestras dopadas al principio del tratamiento de muestra (muestras C) y al final del mismo (muestras B). Con la precipitación de proteínas se obtenían recuperaciones del 60% confirmando que la adición de metanol no es suficiente para liberar los analitos de las lipoproteínas.

Del mismo modo se llevó a cabo la extracción Bligh/Dyer, tal como se detalla en el apartado 3.5. Se obtuvo una recuperación promedio del 95%. Los valores oscilaron entre 91% para desmosterol y 101% para sitosterol, confirmando que este tratamiento conseguía separar los analitos de las

lipoproteínas y mantenerlos solubles. Los resultados se muestran en la Figura 2.6.

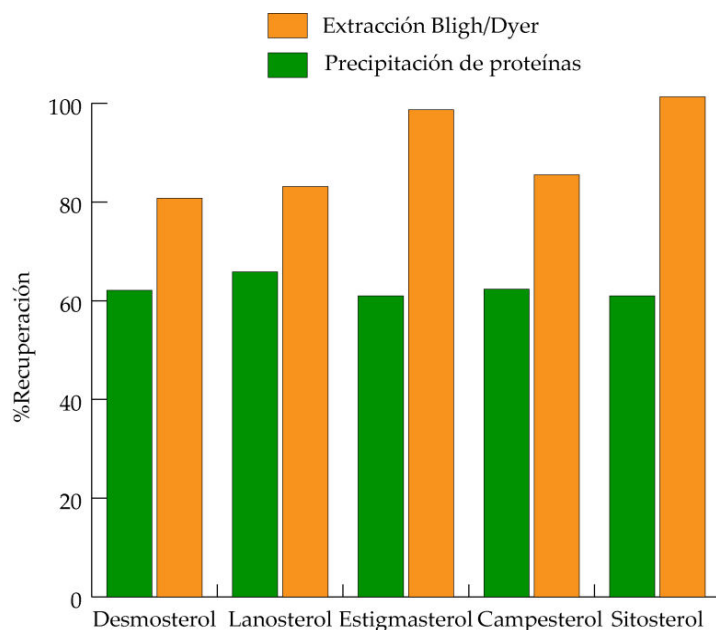


Figura 2.6. Comparación de las recuperaciones obtenidas aplicando una precipitación de proteínas o una extracción Bligh/Dyer

4.2.2-Inyección en el sistema online

La fase inferior recuperada del extracto Bligh/Dyer es mayoritariamente cloroformo que es inmiscible con el agua de la fase móvil inicial. La inyección directa del extracto no era posible pero era preferible evitar llevar el extracto a sequedad para reconstituirlo posteriormente en un disolvente compatible porque supondría un paso más en el tratamiento de muestra y una probabilidad de perder analitos. Para resolver este problema se aprovecharon

las propiedades del diagrama ternario agua-metanol-cloroformo, mostrado en la Figura 2.7. Añadiendo 1mL de metanol, el extracto podía ser inyectado.

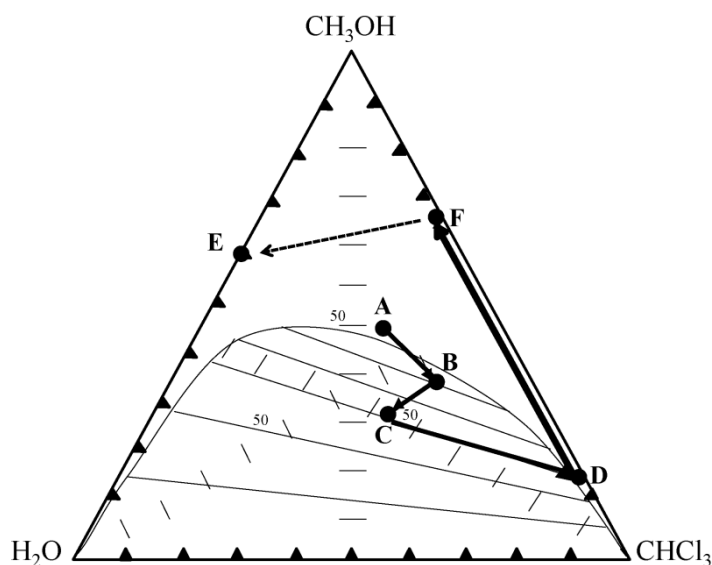


Figura 2.7. Diagrama ternario agua-metanol-cloroformo. Se muestra con flechas la composición del extracto a lo largo del tratamiento de muestra

El punto A representa la composición de la muestra de suero tras la adición de la mezcla Bligh/Dyer (1mL de cloroformo-metanol (1:2, v/v)). La adición posterior de cloroformo, punto B, y agua, provoca la aparición de dos fases, punto C. Tras la centrifugación de la muestra, se pueden ver claramente diferenciadas dos fases separadas por una capa de proteínas. Los esteroides están en la fase inferior, que se recupera, cuya composición está representada en el diagrama por el punto D y es mayoritariamente cloroformo. La adición de metanol proporciona una única fase líquida, punto F, que es compatible con la fase móvil inicial (60% metanol y 40% agua Milli-Q), punto E, puede verse que

cualquier desplazamiento entre los puntos E y F están alejados de la región bifásica.

4.3-ETAPA DE CARGA

Para determinar el volumen óptimo de muestra que se podía inyectar en el sistema se realizó un experimento probando diferentes volúmenes de inyección.

Con este ensayo se pretendía determinar el volumen de muestra que puede ser cargado en un lecho sorbente, el *RAM* en este caso, de manera que se obtenga una relación determinada de concentración de analito entre la entrada y salida del lecho. Este concepto es también conocido como volumen de ruptura (Poole y cols.,2000). Pueden considerarse volúmenes de carga óptimos aquellos en los que la concentración de analitos a la salida del cartucho no supera el 1% de la concentración inicial de analito introducida en el mismo (Ortega y cols.,2001).

Se realizaron experimentos inyectando los siguientes volúmenes: 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, 500 μ L. Se recogieron fracciones de 2mL durante cada minuto de la etapa de carga y se determinaron por inyección directa en el espectrómetro de masas, sin realizar cromatografía.

Se comprobó que 300 μ L era el volumen óptimo de inyección, ya que era la máxima cantidad que se podía inyectar sin superar el volumen de ruptura del *RAM*. Los resultados se muestran en la Figura 2.8. Puede verse la señal de las fracciones recogidas a lo largo de los cuatro minutos de la etapa de carga,

solamente apreciable en la primera y segunda fracción en comparación con la señal que daba la muestra de suero original.

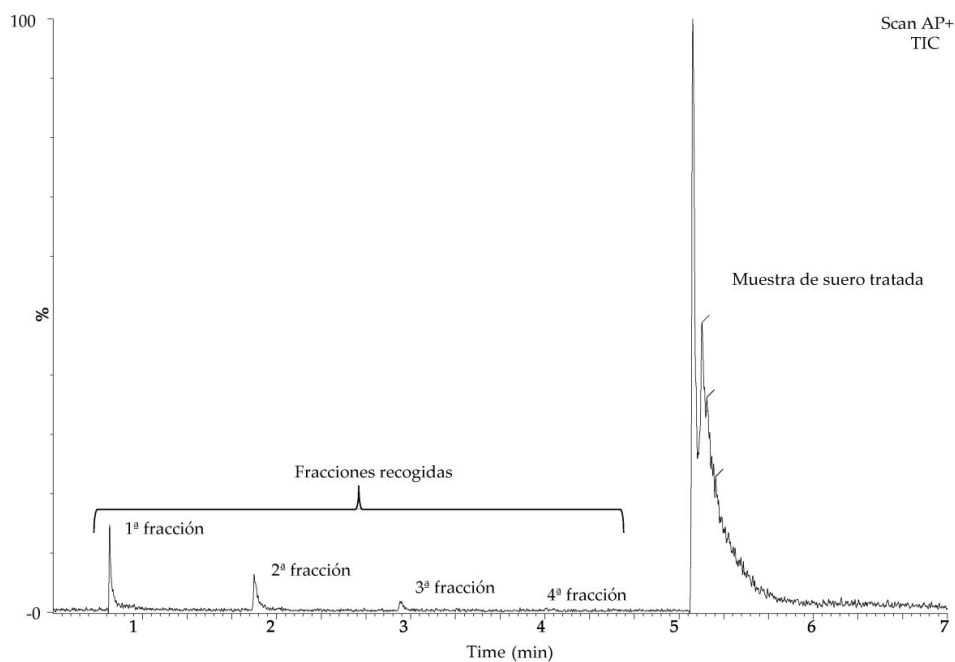


Figura 2.8. Determinación del volumen óptimo de carga de muestra en el sistema online

4.4-ETAPA DE LAVADO

Tras la etapa de carga comienza la etapa de lavado. Se utilizó un caudal de 2ml/min de agua Milli-Q durante 1minuto, este disolvente había mostrado resultados satisfactorios eliminando interferencias en trabajos previos (Mendiara y cols.,2012). Los enlaces peptídicos absorben en el ultravioleta lejano (180-230nm) (Devlin,2002) luego el detector de absorbancia puede medir la señal de las proteínas a 220nm cuando salen del RAM.

El perfil de absorbancia de una inyección se muestra en la Figura 2.9. Se puede ver que la mayoría de las proteínas se eliminan durante el primer minuto en la etapa de carga, prolongándose hasta el minuto 5, cuando al mantenerse la señal por debajo de 0,05UA a 220nm se consideraron completamente eliminadas.

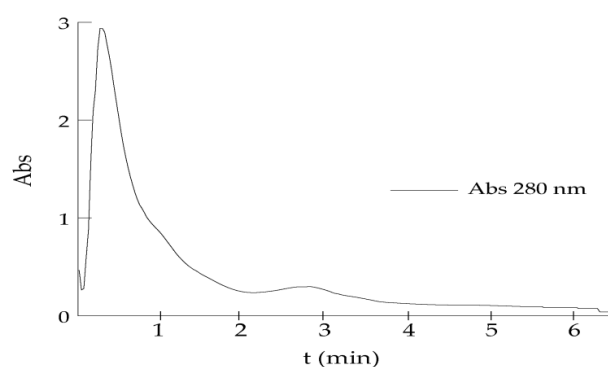


Figura 2.9. Perfil de absorbancia de una muestra de suero durante la etapa de carga y lavado

4.5-ETAPA DE ELUCIÓN

4.5.1-Volumen de elución

Estudios anteriores demostraron que 2-propanol era un buen disolvente para la recuperación de los esteroides de un cartucho con fase estacionaria C_{18} (Mendiara y cols.,2012).

El perfil de elución del sistema online se determinó mediante la recolección de fracciones de 0,4mL del cartucho *RAM* en el modo *backflush* durante 40 minutos. Las fracciones fueron posteriormente analizadas mediante inyección directa en el espectrómetro de masas. Se demostró que

9mL de 2-propanol recuperaron cuantitativamente los analitos del cartucho (96%). Esta etapa tiene una duración de 24 minutos.

En la Figura 2.10 puede verse que cada pico corresponde a una fracción recogida, registrada como *Total Ion Chromatogram* en modo SCAN.

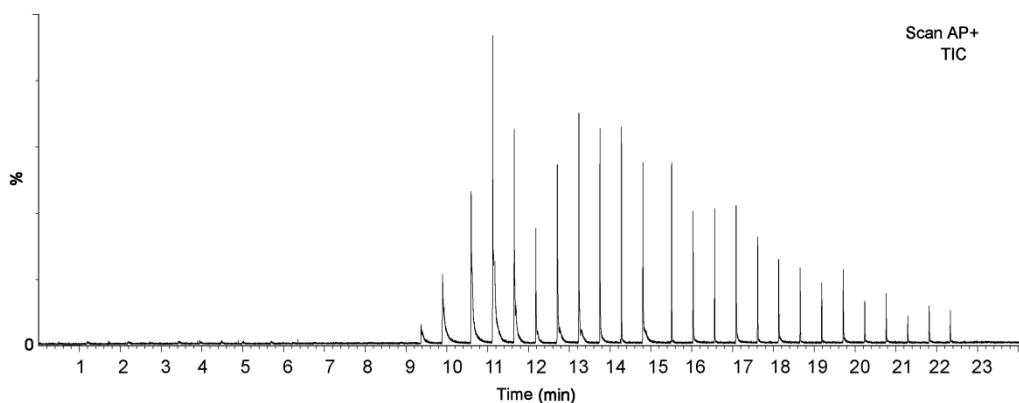


Figura 2.10. Determinación del volumen de recuperación de los analitos en el sistema online.

4.5.2-Trabajo utilizando dos fases reversas

Al diseñar el método online hubo que tener en cuenta que tanto el cartucho RAM como la columna analítica eran fase reversa (C_{18}), es decir, el sistema no era ortogonal (Schoenmakers y cols.,2003), por lo que el 2-propanol empleado en el RAM como disolvente de elución no era buen disolvente para introducir a los analitos en la cabeza de la columna, ya que también provocaba su elución, comprometiendo la siguiente etapa de cromatografía.

El problema se solucionó, añadiendo un caudal de 0,6mL/min de agua Milli-Q al caudal de 2-propanol que salía del cartucho RAM, previa introducción en la columna.

Para encontrar la cantidad de agua necesaria para reducir la fuerza eluotrópica del 2-propanol se preparó una solución de patrones a $1\mu\text{g/mL}$ de todos los esteroides en 2-propanol y se inyectó en el sistema online.

Posteriormente, fueron incrementándose los volúmenes de agua Milli-Q que se añadían desde la bomba 2 al caudal saliente del RAM. Los resultados se muestran en la Figura 2.11.

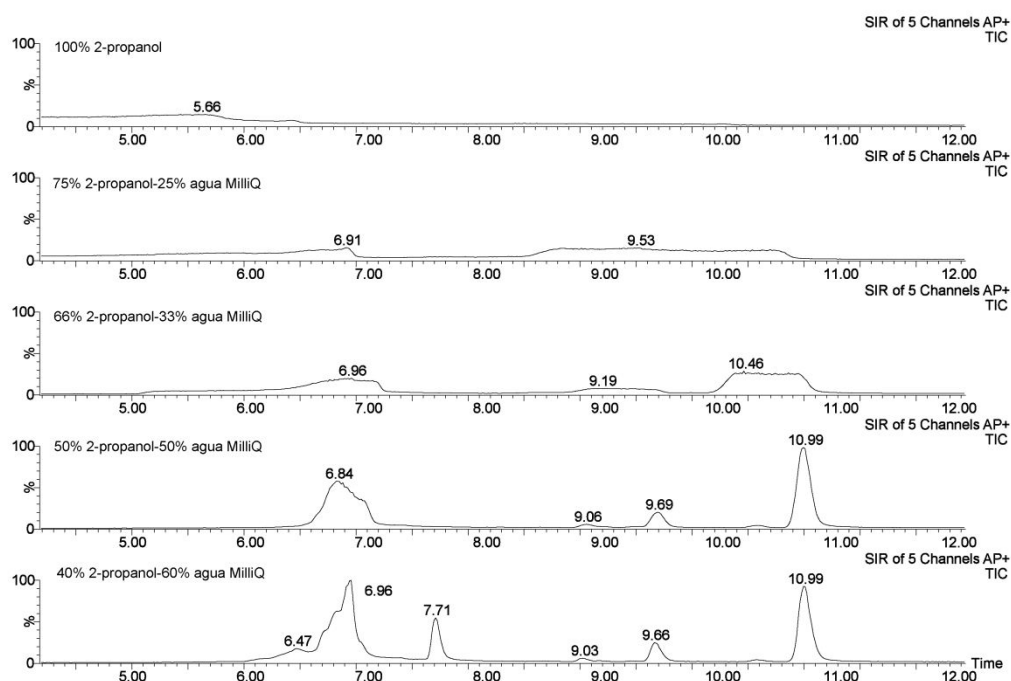


Figura 2.11. Estudio de la fuerza eluotrópica de las mezclas 2-propanol-agua MilliQ

Se puede ver como la fuerza eluotrópica se ve reducida gracias a la adición de agua. Cuando se trabaja con 100% de 2-propanol, no se ven picos en la cromatografía porque se han eluido antes de comenzar.

Cuando el porcentaje de agua Milli-Q en el caudal que entra a la columna es 25%-33%, la cromatografía sigue sin ser posible, sólo se ven bandas de compuestos sin separar. Sin embargo, cuando el porcentaje aumenta a 50% comienza a tener lugar la separación cromatográfica.

Cuando el porcentaje de agua Milli-Q representa el 60% los analitos quedan retenidos en la cabeza de la columna hasta el inicio del gradiente cromatográfico. Es entonces cuando se produce la separación, permitiendo además la correcta cuantificación de los analitos. De estos resultados se concluyó que la composición del caudal que entra a la columna debe contener al menos el 60% de agua Milli-Q (v/v) lo que supone 1,5 veces más que el caudal de 2-propanol.

4.6-DETECCIÓN

4.6.1-ESI vs APCI

La ionización *APCI* es aplicable a compuestos que tienen carácter muy apolar como es el caso de los esteroides. Además, son moléculas de tipo lipofílico y su estructura no ofrece posibilidad para que ocurran procesos de protonación/deprotonación necesarios como para plantearse utilizar la ionización mediante *ESI*, que suele utilizarse con compuestos polares de una amplia gama de pesos moleculares (Rossmann y cols.,2007).

4.6.2-SIR vs MRM

Los esteroides se detectaron como $[M+H-H_2O]^+$, que corresponde a la pérdida del grupo hidroxilo como una molécula de agua. Esto se observa comúnmente en la ionización química de alcoholes (McLafferty y cols.,1993). Se probaron los dos modos posibles de detección *MRM* y *SIR*. Los valores de señal/ruido obtenidos en el modo *SIR* eran mucho más altos que los del modo *MRM*. Los resultados se muestran en la Figura 2.12. En este caso, la selectividad proporcionada por el modo *MRM* no fue suficiente para compensar la pérdida de sensibilidad.

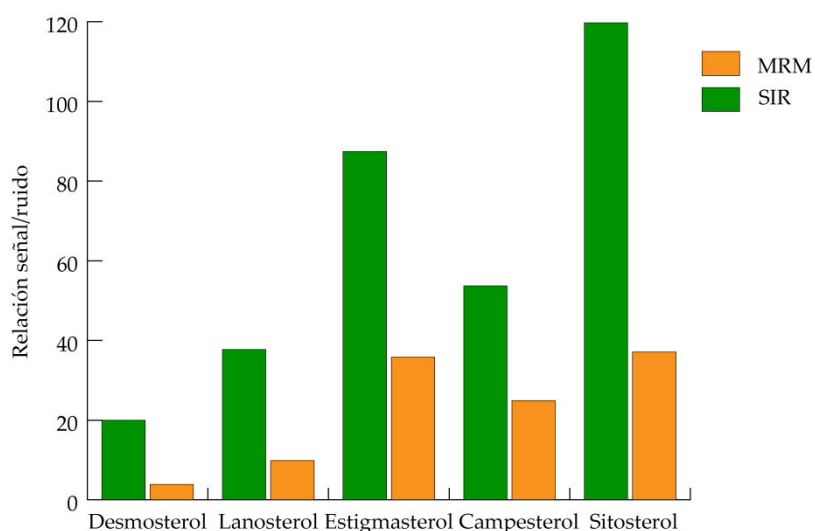


Figura 2.12. Valores de la relación señal/ruido para los esteroides estudiados

4.7-EVALUACIÓN DEL MÉTODO

4.7.1-Contaminación cruzada

Como se explicó anteriormente, el método de Bligh/Dyer consigue separar las proteínas de los lípidos y simultáneamente, mantiene solubles a los analitos, pero junto a ellos también se encuentra una gran cantidad de colesterol y otros lípidos que pueden ser causantes de problemas de contaminación cruzada. Hay estudios que demuestran que los fosfolípidos y triacilglicerolos (coextraídos en el caso del suero con el Bligh/Dyer) quedan fuertemente retenidos en la columna y pueden ir acumulándose gradualmente, especialmente cuando se usan fases móviles acuosas. Según los datos encontrados en la bibliografía (Ismail y cols.,2008; Ismail y cols.,2010) utilizar un 35% de 2-propanol en la fase móvil resulta esencial para eluir todos los lípidos de la columna y de la pre-columna.

Durante el desarrollo del método se observó la aparición de bandas de compuestos en las inyecciones de blanco de disolvente (metanol). Este problema se solucionó alargando el gradiente cromatográfico cinco minutos con 2-propanol a 0,3mL/min tras la elución del último compuesto. Para comprobar la mejoría se hicieron dos series de inyecciones: una incluyendo este último paso y otra sin incluirlo. En la primera se inyectó una muestra de suero y seguidamente tres blancos (metanol) consecutivos y no se incluyó etapa de limpieza. En la segunda se procedió de la misma manera pero incluyendo la etapa de limpieza.

La Figura 2.13 muestra la mejora que se experimenta en los cromatogramas cuando se añade este último paso. Puede verse que cuando no se añade etapa de limpieza a lo largo de las sucesivas inyecciones, (concretamente en la segunda) aparecen bandas de compuesto que provienen de inyecciones anteriores. La detección se realizó en modo SCAN. Se pudo comprobar que la banda aparecía al buscar la m/z 369. Esta m/z es característica del colesterol y de sus ésteres (1000 veces más concentrados en las muestras de suero que los analitos objeto de estudio). Así que podría pensarse que son esos compuestos los responsables del efecto memoria en estos análisis.

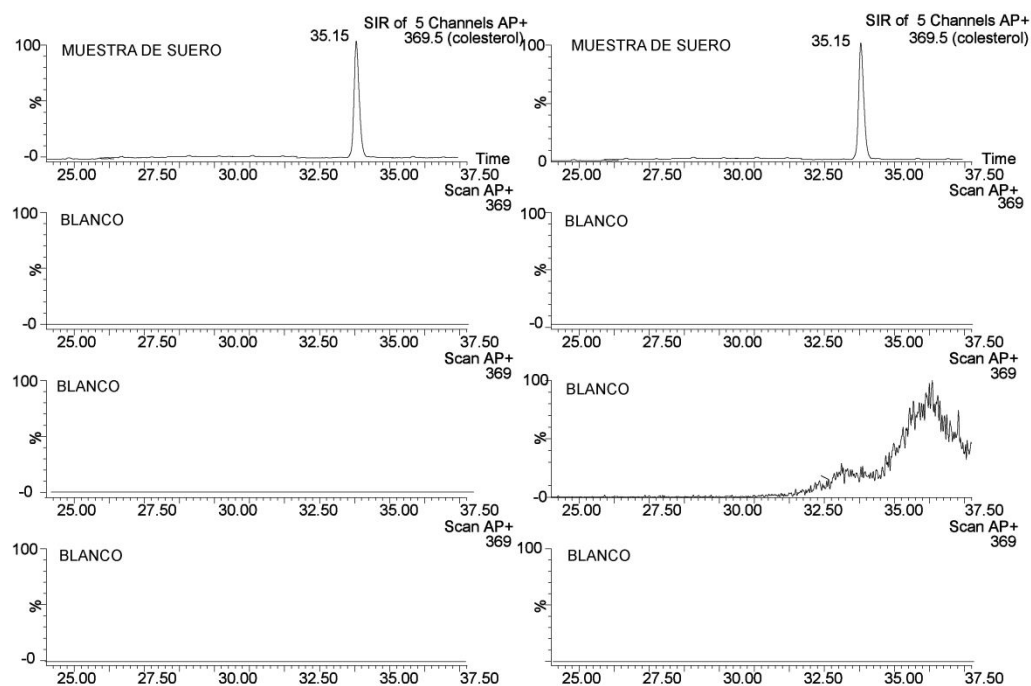


Figura 2.13. Estudio de contaminación cruzada en el sistema online y efecto de del 2-propanol en la limpieza de la columna (columna izquierda) en comparación cuando no (columna derecha)

4.7.2-Efecto matriz y recuperación

Otro de los inconvenientes en el análisis de muestras biológicas es la presencia de efectos matriz. Por eso resulta aconsejable verificar su ausencia cuando se desarrolla un método analítico con muestras biológicas. Ya que pueden afectar a aspectos importantes de un método como la recuperación, cuantificación y la eficacia global del proceso analítico (Georgi y cols.,2006; Nguyen y cols.,2011; Trufelli y cols.,2011).

Siguiendo el protocolo propuesto por Trufelli se evaluaron los efectos matriz, la recuperación del proceso de extracción y la eficacia global del proceso. Se llevaron a cabo las cuatro series de experimentos detallados en el apartado 3.6.5.

Los resultados obtenidos mostraban prácticamente la inexistencia de efectos matriz en todos los analitos. Los valores encontrados estuvieron alrededor del 100%, salvo para el estigmasterol que fue 90%. En este último caso la señal se veía débilmente afectada por otros compuestos provenientes del suero. Una posible explicación puede encontrarse en que este compuesto eluye prácticamente al mismo tiempo que lo hace el colesterol, aunque la pérdida de señal por este motivo no era muy acusada y permitía la correcta cuantificación del compuesto.

Los valores de rendimiento de la extracción fueron desde el 91% para el desmosterol hasta el 101% para el sitosterol. Lo que confirmaba, como ya se ha

mencionado anteriormente, la ausencia de pérdidas importantes de analitos a lo largo del proceso.

Finalmente se determinaron los valores de eficacia global del proceso. Los valores fueron desde 90% (estigmasterol y campesterol) hasta 97% (desmosterol y lanosterol). Estos valores sugieren que la respuesta de las muestras dopadas (muestras C) no era tan diferente de las que no contenían matriz (muestras A), por lo que el tratamiento de muestra empleado es el adecuado y consigue eliminar suficientemente la matriz como para no afectar a la determinación de los analitos. Por este motivo, se pudo realizar un calibrado externo, prescindiendo de métodos más laboriosos como la adición estándar.

4.7.3- Características analíticas

Se determinó la curva de calibrado y el rango lineal, los límites de detección y cuantificación, la repetibilidad y la precisión intermedia. Las curvas de calibrado para ambos analitos resultaron ser lineales en dos órdenes de magnitud con coeficientes de regresión que oscilaron entre 0,990 para campesterol y 0,999 para sitosterol.

Los valores de los límites de detección encontrados estuvieron en el rango de los $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ siendo el más bajo para lanosterol 0,2 y el más alto 13 para sitosterol. Los límites de cuantificación fueron $0,8\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para lanosterol y $43\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para sitosterol, todos ellos eran los adecuados para poder analizar esteroides en suero humano. Los resultados se resumen en la Tabla 2.5

Tabla 2.5 Parámetros analíticos del método online

Compuesto	Coeficiente de correlación(r^2)	Intervalo lineal (ng·mL ⁻¹)	LOD (ng·mL ⁻¹)	LOQ (ng·mL ⁻¹)
Desmosterol	0,991	17-2700	5,0	17
Lanosterol	0,999	1-527	0,2	1,0
Estigmasterol	0,994	25-5220	7,5	25
Campesterol	0,990	25-9270	7,5	25
Sitosterol	0,999	43-7030	13	43

Los valores de exactitud y precisión (repetibilidad y precisión intermedia) se evaluaron mediante muestras dopadas a dos niveles de concentración, con la intención de cubrir todo el rango de valores a analizar cuando se procesan muestras de individuos normales y de individuos cuyos valores de los analitos están alterados debido a alguna enfermedad.

Los niveles seleccionados fueron la mitad de la concentración encontrada en el suero y la décima parte según los niveles establecidos por la base de datos *HMDB* y se muestran en la Tabla 2.6 (Wishart y cols.,2013).

Los valores de recuperación obtenidos para el nivel más alto de concentración estuvieron en el rango del 90% a 105% y entre el 98% y el 111% en el rango de menor concentración. En los dos niveles, los valores resultaron ser consistentes y reproducibles. Puede observarse que los valores de repetibilidad (n=6), y de precisión intermedia (n=3) oscilaron entre el 5% y 15%. Estos valores entraban dentro de los estándares requeridos para la determinación de estos analitos en suero (Rambla-Alegre y cols.,2012). Los resultados correspondientes a todos estos parámetros se muestran en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Exactitud, repetibilidad y precisión intermedia del método online

Compuesto	ng·mL ⁻¹ añadidos	ng·mL ⁻¹ calculados	Exactitud (%)	Repeti- bilidad (%)	Precisión intermedia (%)	ng·mL ⁻¹ pool
Desmosterol	211	212±4	100	6	8	830±230
	45	50±6	111	11	12	
Lanosterol	40	36±5	90	4	9	170±40
	8.5	9±3	106	6	13	
Estigmasterol	405	400±5	105	5	10	1350±420
	87	85±10	98	11	14	
Campesterol	745	743±7	99	7	12	1490±260
	160	165±10	103	10	15	
Sitosterol	442	446±9	101	5	8	1280±70
	96	94±5	98	12	15	

4.8-ANÁLISIS DEL POOL DE SUERO

Para finalizar el trabajo se determinó el valor de la concentración de los analitos en el pool de suero. Como se explicó anteriormente, a lo largo de la historia los metil-esteroles libres lanosterol, y el desmosterol reflejan la síntesis de colesterol en el organismo (Kempen y cols.,1988; Miettinen y cols.,1990). La Tabla 2.6 muestra las concentraciones de precursores obtenidas. Puede verse que no difieren con las encontradas en la bibliografía (Björkhem y cols.,1987; Gylling y cols.,1992; McDonald y cols.,2012; Mendiara y cols.,2012).

Los fitoesteroles del suero han sido ampliamente empleados como marcadores de la absorción intestinal del colesterol e indicadores del consumo en la dieta (Thompson,2004) esto hace que presenten mayor rango en las concentraciones de referencia a las que pueden encontrarse, pero en todos los casos los valores calculados, se mantuvieron en el intervalo sugerido por *HMDB* (Wishart y cols.,2013).

5-CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas a lo largo del trabajo de este capítulo se resumen a continuación:

- I. Se ha conseguido una automatización del proceso de análisis acoplando tres sistemas de cromatografía líquida para que operen simultáneamente.
- II. El protocolo reduce al mínimo el tratamiento de muestra respecto de los métodos convencionales de análisis de esteroides, ya que sólo se necesita una extracción y una dilución del extracto para poder inyectarlo directamente en el sistema.
- III. Es posible trabajar con un sistema online con fases estacionarias no ortogonales. En este caso ha sido posible añadiendo un caudal de agua adicional al caudal de 2-propanol que sale del cartucho *RAM* antes de llegar a la columna
- IV. Los valores obtenidos con el método desarrollado están de acuerdo con los encontrados en bibliografía.

CAPÍTULO 3: DETERMINACIÓN DE HIDROXIESTEROLES EN HÍGADO DE RATA.

1-INTRODUCCIÓN

El trabajo de este capítulo se centra en la determinación de hidroxiesteroles en hígado de rata. Estos animales se utilizan como modelos experimentales para el estudio *in vivo* del gen *Cyp7b1*. Dependiendo de la funcionalidad del gen los animales se clasifican en:

- a) Individuos sanos o *wild-type* (WT) que tienen el gen *Cyp7b1* funcional.
- b) Individuos enfermos o ratas *knock-out* (KO) cuyo gen *Cyp7b1* no es funcional. Este último modelo se genera mediante la inserción de un transposón (fragmento de *DNA*) en los cigotos.

- c) Individuos enfermos sometidos a terapia génica (ratas plásmido).
Estos animales, son ratas *KO* cuyo gen *Cyp7b1* no es funcional, pero se les ha inyectado un plásmido (molécula de *DNA* ajena al genoma del animal, capaz de realizar la función del gen).

Como se explicó en la introducción general, este gen se expresa en el hígado, órganos reproductores y cerebro. El 25 y 27-hidroxicolesterol se han postulado como sustratos del enzima que codifica el gen *Cyp7b1*, (Stiles y cols.,2009). Normalmente cualquier fallo relacionado con la funcionalidad del gen provoca una acumulación de sus sustratos y/o escasez de productos finales, resultando perjudicial para el organismo donde ocurre. Es necesario saber también, que los hidroxiesteros juegan un papel importante en la regulación celular de los genes implicados en el metabolismo lipídico. El aumento de hidroxiesteros celulares puede traducirse en una disminución de la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Li-Hawkins y cols.,2000; Norlin y cols.,2004).

La ventaja que aporta realizar estudios en modelos animales es que las conclusiones obtenidas pueden ser aplicadas para el mismo problema en humanos, aunque también hay que conocer los límites del modelo animal estudiado, todavía en proceso de estudio (Reboldi y cols.,2014).

El inconveniente, es que los hidroxiesteros son, en general, difíciles de analizar debido a sus bajas concentraciones en tejido (siempre en el rango de $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$), su semejanza estructural entre los mismos, y el exceso de colesterol que hay en los tejidos donde ellos se encuentran (Helmschrodt y cols.,2013).

Por otro lado, la otra novedad que se presenta en este capítulo es la realización de análisis en muestras postprandiales, es decir, muestras que se han obtenido tras la ingesta de alimentos. El interés de este estudio se fundamenta en que la mayoría del tiempo de la vida de los animales transcurre en los periodos post-alimenticios o postprandiales. Sin embargo, la mayoría de las pruebas analíticas se realizan en condiciones de ayunas y suelen utilizarse como estándar para establecer un patrón y poderlo aplicar a toda población, adjudicando de este modo, unos valores de referencia máximos y mínimos. Estos resultados podrían no reflejar la situación real y por ello se sugiere la realización de análisis postprandiales (Martínez-Beamonte y cols.,2013).

2-OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo es desarrollar un método para determinar 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en hígado de ratas *KO* y *WT* en diferentes situaciones metabólicas (ayuno y postprandial) Con la finalidad de obtener más información sobre el funcionamiento del gen *Cyp7b1*.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar un método rápido de homogeneizado de la muestra.
- Evitar la generación de artefactos durante la hidrólisis alcalina.
- Elaborar un procedimiento de extracción en fase sólida, incluyendo la comparación de diferentes sorbentes, para seleccionar el que mejores características muestre con los analitos a determinar.
- Determinar la concentración de hidroxiesteroides en ratas *WT*, ratas *KO* y ratas plásmido en situación de ayuno y postprandial.

3-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1-MATERIALES Y REACTIVOS

Los estándares utilizados fueron 25-hidroxicolesterol: (pureza 99%, número CAS: 2140-46-7), 27-hidroxicolesterol (99%, 20380-11-1), y 25-hidroxicolesterol-26,26,26,27,27,27 (d6) (estándar interno, 99%,88247-69-2). Todos fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids (Alabaster,AL,EEUU). Colesteril estearato (96%,35602-69-8), hidróxido de potasio (85%,1310-58-3), Butilhidroxitolueno (BHT) (99%,128-37-0) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los disolventes utilizados fueron metanol (calidad analítica para LC-MS, 67-56-1), etanol (calidad analítica HPLC, 67-63-0), cloroformo (calidad analítica para HPLC, 67-66-3), hexano (96%; 110-54-3). Los disolventes provienen de Sharlab (Barcelona, España). El agua se suministraba por un equipo Milli-Q Plus 186 de Millipore (Billerica, MS,EEUU).

Todas las disoluciones necesarias tanto para la optimización como para la cuantificación se prepararon a partir de disoluciones patrón conteniendo los compuestos aproximadamente $1000\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol., excepto colesteril estearato que se preparó en hexano. Siempre fueron conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los cartuchos de extracción en fase sólida utilizados fueron MFE®-PAK Amino (500mg/3mL) proporcionados por Análisis Vínicos (Tomelloso, CR España) DSC-Si (500mg/3mL) proporcionados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). La extracción se llevó a cabo utilizando un manifold con capacidad para veinte muestras y aplicando vacío mediante una bomba.

3.2-INSTRUMENTACIÓN

Se utilizó una Balanza analítica GR-202-EC A&D Instruments LTD (Tokio, Japón); un Homogeneizador Ultra-Turrax (IKA® T18 basic, Stauffen, Alemania); un Agitador Rotacional (Barcelona, España); Centrífuga Selecta Centromix (Salamanca, España); un Manifold ,Waters (Milford, MA; EE.UU.); un Vórtex Velp Scientifica Instruments 50-60 Hz (Usmate, MB; Italia); un baño de Ultrasonidos Branson 3510 MTH (Fredericksburg, Virginia, USA). Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de ultra-alta resolución *ACQUITY UPLC™ H-Class* acoplado a *TQD* espectrómetro de masas triple cuadrupolo ambos de Waters (Milford, MA, EE.UU.).

3.3-MUESTRAS

Las ratas *KO* fueron generadas por sucesiones de cruzamientos de ratas *WT* heterocigotas para el gen *Cyp7b1*. Fueron alimentadas en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. Eran mantenidas en jaulas que contenían 3-4 animales por jaula. Tenían libre acceso al agua y al pienso (Harlan S.A., Barcelona, España). El habitáculo estaba a 20°C con ciclos de luz de 12 horas día/noche. En el momento del sacrificio tenían 2 meses de edad y 250-300g de peso. Ayunaron de 4 a 18 horas antes de los experimentos. Para los experimentos postprandiales fueron alimentadas con 5mL de aceite de oliva virgen extra (Aceites Toledo, España), 8 horas antes del sacrificio. A las ratas *KO* seleccionadas para terapia génica se les inyectó el plásmido a través de la cola dejando tiempo suficiente para su expresión antes del sacrificio.

Las muestras de hígado fueron obtenidas según los criterios de la Unión Europea para el cuidado y el uso de animales de laboratorio para investigación y el protocolo fue aprobado Comité de Ética de Investigación Animal de la Universidad de Zaragoza. Tras las extracciones, el hígado fue conservado a -80°C antes y después de su uso experimental.

3.4-TRATAMIENTO DE MUESTRA

3.4.1-Hidroxiesteroles libres

Con la ayuda de un bisturí se selecciona un trozo de hígado de 0,2g y se introduce en un tubo de vidrio. Siguiendo el método de Folch (Folch y cols.,1957), se añaden 3,75mL (4,60g) de una mezcla cloroformo/metanol (2:1, v/v) a la que previamente se han añadido 9,5 μL de una disolución de 9,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ estándar interno y 13 μL de una disolución de butilhidroxitolueno (BHT) de 1150 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ambas en metanol. Posteriormente, se procede al homogeneizado del tejido con la ayuda de un ultraturrax durante 15-20 segundos a 6000rpm. Una vez que el tejido está disgregado, se trasvasa a un tubo nuevo (tubo 2). Al tubo inicial (tubo 1) se le añaden 1,25mL de cloroformo y se vuelve a homogeneizar 10 segundos en el ultraturrax a la misma velocidad, con la finalidad de arrastrar el tejido remanente. Posteriormente, se trasvasa al tubo 2. Se repite este último proceso para el tubo 1 pero con 1,25mL de agua Milli-Q. Todo ello se lleva a un agitador rotacional y allí se mantiene durante 10 minutos. Después se centrifuga a 3000rpm durante 10 minutos. Tras la separación de las fases, se recupera la fase inferior, (mayoritariamente el

cloroformo) con una pipeta Pasteur de vidrio y se lleva a sequedad bajo corriente de N_2 a $40^\circ C$ en un baño de agua. Seguidamente, se añade 1mL hexano y se introduce en un baño de ultrasonidos a T^a ambiente durante 5 minutos. Tras esto se procede al proceso de extracción en fase sólida.

3.4.2-Hidroxiesteroides totales: hidrólisis alcalina

Si se quiere determinar la concentración total de hidroxiesteroides en hígado, el protocolo anterior cambia tras realizar la extracción de Folch. A partir de este punto se añaden los siguientes pasos: Una vez obtenida la fase inferior, mayoritariamente cloroformo, se le añaden 2mL de una disolución recién preparada de hidróxido de potasio 0,9M etanol/agua Milli-Q (9:1, v/v). Tras esto y una breve agitación en el vórtex, se deja 1 hora y 30 minutos a $37^\circ C$. Tras la reacción se espera a que enfríe a T^a ambiente y se añade 1mL de cloruro de sodio saturado (1g de cloruro de sodio en 3mL agua Milli-Q) y se agita de nuevo brevemente en el vórtex. Seguidamente se añaden 2mL de cloroformo y se centrifuga 5 minutos a 3000rpm. Tras la separación de las fases, se vuelve a recoger la fase inferior que se trasvasa a un tubo de vidrio limpio. Se procede a reextraer con 1,5mL cloroformo y se centrifuga de nuevo durante 5 minutos a 3000rpm. Se junta este segundo extracto clorofórmico con el primero y se llevan a sequedad bajo corriente de N_2 a $40^\circ C$ mantenido gracias a la ayuda de un baño de agua. Posteriormente, se añade 1mL de hexano y se introduce en un baño de ultrasonidos a T^a ambiente durante 5 minutos. Tras esto se procede al proceso de extracción en fase sólida

3.5-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

El extracto re-disuelto en 1,0mL de hexano se hizo pasar a través de un cartucho MFE®-PAK Amino. La abertura de salida del manifold y el vacío se ajustaron de tal modo que el caudal de disolvente a través del cartucho fue de 1,0-1,5mL/min. El procedimiento de extracción fue el siguiente: acondicionamiento del cartucho, que se realizó con 2mL de metanol, posteriormente se equilibró con 5mL de hexano. La carga fue: 1mL de extracto en hexano; el lavado 1mL de hexano y la recuperación se realizó en 4mL de cloroformo/metanol (23:1, v/v). Un esquema del procedimiento se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Protocolo de SPE para aislamiento de hidroxiesteroides

Acondicionamiento	2 mL metanol
Equilibrado	5 mL hexano
Carga	1 mL extracto en hexano
Lavado	1 mL hexano
Recuperación	4 mL cloroformo/metanol (23:1, v/v).

Los 4mL recuperados se llevaron a sequedad utilizando una corriente de N₂, realizando la evaporación en un baño de agua a 40°C. Finalmente, la muestra se redisolvió en 0,2g de metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v) y se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. De este modo la muestra quedaba lista para su análisis cromatográfico.

3.6-ANÁLISIS POR LC/MS

Las condiciones de análisis se muestran en la Tabla 3.3. Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el programa MassLynx v.4.1 de Waters (Milford, MA, EE.UU).

Tabla 3.3. Condiciones experimentales para la cuantificación de hidroxiesteroides en hígado

Columna	UPLC™ BEH C18 100 mm x 2,1 mm x 1,7 μm				
Temperatura de la columna	40 °C				
Temperatura de la muestra	10 °C				
Volumen de inyección	20 μL				
Fase móvil	Disolvente A	Metanol con ácido fórmico 0,1% (v/v)			
	Disolvente B	Agua Milli-Q con ácido fórmico 0,1% (v/v)			
	Caudal	0,300 mL/min			
Gradiente	Tiempo (min)	Disolvente A (% v/v)			
	0,00	70			
	2,00	70			
	2,10	85			
	4,00	85			
	14,00	100			
	19,00	100			
	19,10	70			
	22,00	70			
Interfase	Electrospray				
Modo de detección	SIR				
Ionización	positivo				
Voltaje del capilar	3,00 kV				
Temperatura de desolvatación	650 °C				
Caudal de gas de desolvatación	600 L/h				
Caudal de gas de cono	40 L/h				
Temperatura fuente	120 °C				
Compuesto	Peso molecular	m/z	Mecanismo	Modo	Voltaje cono (V)
25-hidroxicolesterol	402,65	367,3	[M+H-2H2O] ⁺	ESI+	35
27-hidroxicolesterol	402,65	385,3	[M+H-H2O] ⁺	ESI+	35
25d6-hidroxicolesterol	408,65	373,3	[M+H-2H2O] ⁺	ESI+	30

3.7-PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO

3.7.1-Curva de calibrado y rango lineal

Se prepararon disoluciones con concentraciones en el intervalo desde $20\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ hasta $2000\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v) a partir de las disoluciones patrón de $1000\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol. A cada punto de la recta se le añadieron $300\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estándar interno. Las disoluciones preparadas se inyectaron de forma aleatoria por triplicado. El rango lineal se determinó con seis puntos de calibración, cada uno por triplicado.

3.7.2-Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir del ruido observado en las líneas base de los cromatogramas correspondientes, como tres y diez veces la desviación estándar del blanco, respectivamente.

3.7.3-Precisión: Repetibilidad y precisión intermedia

La repetibilidad del método analítico, tanto para hidroxiesteroles libres como totales, se obtuvo ejecutando el método el mismo día, partiendo de un pool de hígado preparado para 6 muestras ($n=6$). El pool se realizó seleccionando 6 trozos de hígado de diferentes puntos hasta un total de 1,2g, que posteriormente se homogeneizaron en el ultraturrax con 26mL de una mezcla cloroformo/metanol (2:1, v/v) a la que previamente se habían añadido

0,49g de una disolución de $9,5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de estándar interno y 0,35g de una disolución de BHT de $1150\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ambas en metanol. Posteriormente se tomaron seis alícuotas de 3,75mL cada una (4g aproximadamente) y se continuó con el método tal como se describe en el apartado 3.4.

La precisión intermedia para el método de hidroxiesteroles libres como para el de hidroxiesteroles totales, se determinó realizando el procedimiento descrito anteriormente en este mismo apartado durante tres días (n=3).

3.7.4-Recuperación y selectividad

Los estudios de recuperación y selectividad del método se realizaron también utilizando un pool de trozos de hígado. Se siguió el protocolo propuesto por Trufelli (Trufelli y cols.,2011).

- *Las muestras A*

En este caso se prepararon $100\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v).

- *Las muestras B*

Se realizó con pool de hígado para tres muestras (n=3), en total 0,6g tomados de diferentes partes del hígado de 0,2g en 0,2g. Posteriormente, se homogeneizaron en el ultraturrax y se llevó a cabo el protocolo descrito en el apartado 3.4 tanto para hidroxiesteroles libres como totales. Al final del

mismo se dopó cada una con 20mg de una disolución de $1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v).

- *Las muestras C*

Nuevamente, se realizó con pool de hígado para tres muestras ($n=3$), en total 0,6g tomados de diferentes partes del hígado de 0,2g en 0,2g. Por otro lado, se preparó la disolución de extracción compuesta por 11mL de de una mezcla cloroformo/metanol (2:1, v/v), con 0,2 g de una disolución de $9,5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de estándar interno y 0,15g de una disolución de BHT de $1150\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ambas en metanol. En este punto, se dopa con 60mg de una disolución de $1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v). Tras mezclarse tejido y disolución, se homogeneizó en el ultraturrax. Posteriormente se tomaron tres alícuotas de 3,75mL cada una (4 g aproximadamente) y se continuó con el método tal como se describe en el apartado 3.4 tanto para hidroxiesteros libres como para totales.

- *Las muestras D*

Se prepararon tal como se describió en el apartado 3.4 con pool de hígado para tres muestras ($n=3$), tanto para hidroxiesteros libres como totales. De este modo, las ecuaciones que se utilizaron para el cálculo de la recuperación y selectividad son las mismas que las descritas en el capítulo 2 (2-4).

3.7.5-Exactitud

Se realizó con muestras dopadas, muestras sin dopar y muestras sin matriz. Se prepararon tres muestras tipo A, tres muestras tipo C y tres muestras tipo D del mismo modo que el explicado en el apartado anterior, 3.7.4. La ecuación que se utilizó la misma que en el capítulo 2 (1).

3.8-ANÁLISIS DE MUESTRAS

Se determinó la concentración de hidroxiesteroles libres y totales en condiciones de ayuno largo siguiendo el tratamiento de muestra propuesto en los apartados 3.4.1 y 3.4.2. Se estudiaron cinco ratas *WT* y cinco ratas *KO*. En el caso de las ratas sometidas a tratamiento con plásmido se estudiaron seis ratas *KO* que se utilizaron como control y seis ratas plásmido. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados finales se expresaron como medias \pm desviación estándar de grupo.

Se determinó la concentración de hidroxiesteroles libres y totales en condiciones postprandiales. Se estudiaron ocho ratas *WT* y catorce *KO*. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados finales se expresaron como medias \pm desviación estándar de grupo.

Las comparaciones estadísticas se realizaron por la prueba de Mann-Whitney de dos colas, con el paquete de software para Windows (GraphPad Prism 5.0, S. Diego, CA, EE.UU). La significación se estableció en $p \leq 0,05$.

4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1-PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Durante el desarrollo del método para determinar hidroxiesteroles libres se ensayaron diferentes procedimientos para el homogeneizado de la muestra y se optimizó el tiempo de extracción.

Para el método que determina los hidroxiesteroles totales se estudiaron las mejores condiciones de temperatura de la reacción de hidrólisis. Se probó el uso de una disolución salina posterior a la reacción de hidrólisis para ver si mejoraba la extracción, así como la necesidad de realizar extracciones seriadas posteriores a la reacción de hidrólisis.

En cada etapa, se calculó la recuperación y se seleccionó la alternativa que mejores valores proporcionaba. Como se explicó en la introducción del capítulo.

Un esquema del proceso experimental llevado a cabo para el desarrollo del método para determinar hidroxiesteroles libres y totales se muestra en la Figura 3.1

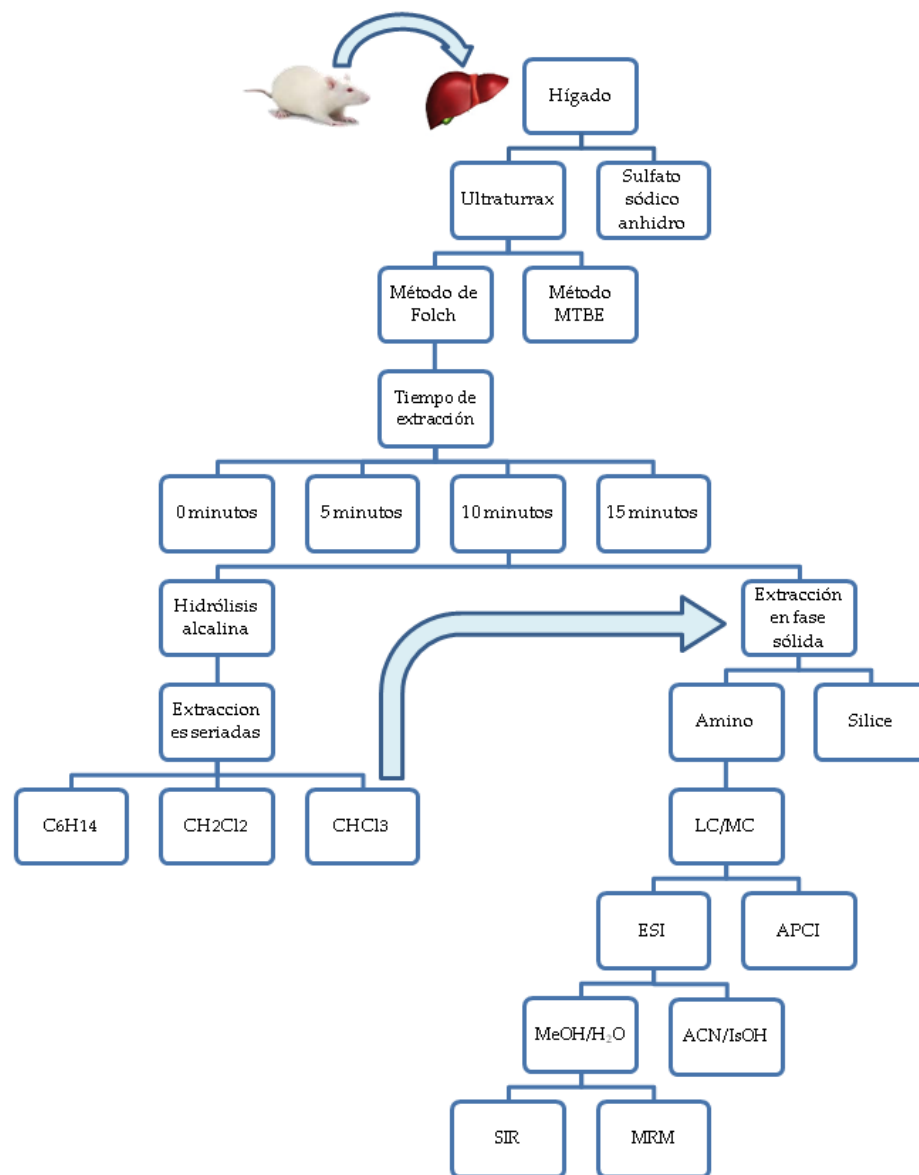


Figura 3.1. Esquema del proceso experimental llevado a cabo para el desarrollo de los mtodos

4.1.1-Homogeneizado de la muestra

Como se explicó en la introducción general, los disolventes apolares resultan buenos agentes extractantes para los lípidos pero la cantidad de agua existente en el hígado también puede actuar como una barrera que evite que el disolvente llegue a todos los puntos del tejido (Nelson,1993). Por este motivo, se probaron dos procedimientos que tenían este hecho en cuenta.

- *Sulfato sódico anhidro vs ultraturrax*

En el caso del homogeneizado con sulfato anhidro de sodio, las muestras se trocearon con ayuda de un bisturí seleccionando 0,2g. Se añadieron 48mg de la disolución de $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en metanol todo se molió en un recipiente porta muestras de vidrio con la suficiente cantidad de sulfato sódico anhidro para conseguir una mezcla de aspecto seco y arenoso como muestra la Figura 3.2 (Echarri y cols.,1998). Tras esto, se continuó con el tratamiento de muestra tal cómo se describe en el apartado 3.4.



Figura 3.2. Apariencia de la muestra de hígado tras homogeneizarse con Na_2SO_4 anhidro

En el caso del método del homogeneizado mediante el uso del ultraturrax, el hígado (0,2g) se mezcla junto al disolvente extractante. En este punto, se probaron dos mezclas de disolventes diferentes. La primera correspondía a la del método de Folch cloroformo/metanol (2:1, v/v); y la segunda a la del método del MTBE metanol/MTBE (1:3, v/v). En ambos casos los disolventes de partida se doparon con 48mg de la disolución de $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en metanol. Todo ello se homogeneizó durante unos segundos en el ultraturrax y se continuó con el tratamiento de muestra explicado en el apartado 3.4.

Para comprobar qué procedimiento era más conveniente (NaSO_4 o ultraturrax), se llevó a cabo un experimento de recuperación. El homogeneizado con ultraturrax fue el que mejores resultados dio en esta primera etapa para ambas mezclas extractantes. Con la mezcla cloroformo/metanol (2:1, v/v) se recuperó un 98% para 25-hidroxicolesterol y un 96% para 27-hidroxicolesterol. Con la mezcla MTBE se recuperó un 60% para 25-hidroxicolesterol y un 80% para 27-hidroxicolesterol. Estos resultados hicieron que se seleccionara el ultraturrax con la mezcla de Folch como método de homogeneizado de la muestra.

Un ejemplo del aspecto que presentó la muestra tras homogeneizarla en el ultraturrax se muestra en la Figura 3.3.

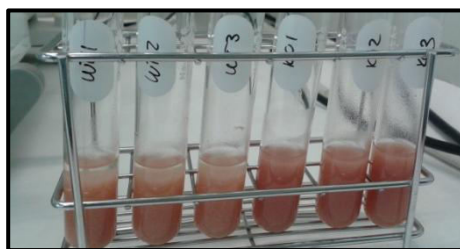


Figura 3.3. Apariencia de la muestra de hígado tras homogeneizarse ultraturrax y mezcla de Folch

4.1.2-Tiempo de extracción

Una vez homogeneizado el hígado con la mezcla cloroformo/metanol (2:1, v/v), se comparó el rendimiento de la extracción directa y la extracción tras haber incubado la muestra con agitación rotacional durante 5, 10 y 15 minutos. Para ello se determinó la recuperación de los analitos en las tres situaciones y a tiempo cero, es decir, sin incubación. Los resultados se muestran en la Figura 3.4.

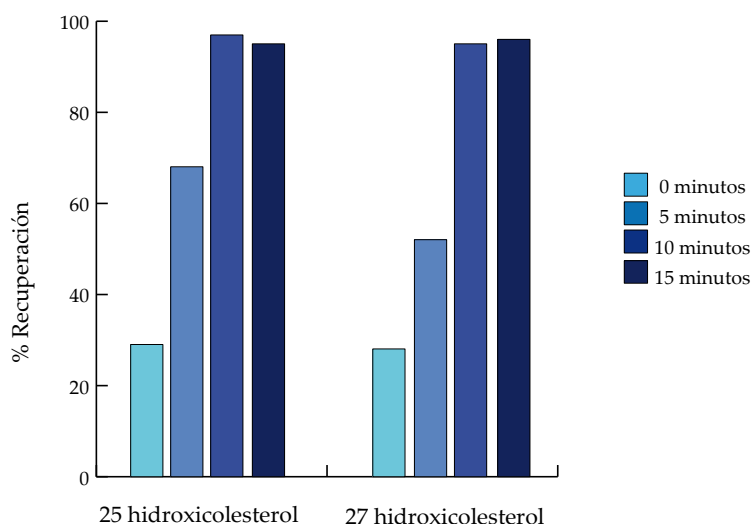


Figura 3.4. Rendimiento de extracción de hidroxiesteroides del hígado en función del tiempo

Se puede observar que los analitos necesitan un tiempo adicional tras el homogeneizado para completar su extracción del tejido. Se observó que con 10 minutos de agitación rotacional era suficiente, ya que no se notaba diferencia entre 10 y 15 minutos. A 10 minutos la recuperación de los analitos en este paso era 97% para 25-hidroxicolesterol y un 95% para 27-hidroxicolesterol

4.1.3-Hidrólisis alcalina

La hidrólisis alcalina es necesaria cuando se quiere determinar la concentración total de los hidroxiesteros del tejido. Proporciona muestras más limpias, ya que elimina triacilglicéridos y los fosfolípidos, generando a cambio ácidos grasos y ésteres metílicos que pueden separarse fácilmente con un protocolo de *SPE* adecuado. A cambio surgen dos inconvenientes que pueden complicar el tratamiento de muestra. Uno de ellos es que se añade un paso más que aumenta las posibilidades de pérdida de analito. El segundo es que la reacción de hidrólisis alcalina puede causar degradación de algunos de los hidroxiesteros o generación de artefactos (Brown y cols.,1999; Busch y cols.,2009). Por ello cuando se realizó hidrólisis alcalina se prestó especial atención a los siguientes puntos:

- *Material de vidrio*

Se han realizado estudios que demuestran que los plásticos son incompatibles con muchos disolventes orgánicos y pueden lixiviar plastificantes en los extractos biológicos y generar contaminación cruzada. (McDonald y cols.,2008). Las puntas de plástico se utilizaron sólo con agua o

sistemas de agua/metanol, y no en las etapas que implicaban disolventes más agresivos.

- *Temperatura del proceso de hidrólisis alcalina*

Hay métodos de hidrólisis alcalina que implican la adición de una disolución de base alcohólica directamente a un extracto seco, seguido por calentamiento a temperaturas elevadas (60-100°C) durante 1 a 2 horas. Estas condiciones resultan duras para los hidroxiesteros y pueden causar su degradación. Sin embargo, ya hubo métodos que demostraron que la hidrólisis alcalina puede funcionar bien a temperatura ambiente (Dzeletovic y cols.,1995) y por eso en este caso se escogieron temperaturas cercanas a las fisiológicas (37°C).

- *Uso de solución salina*

Tras la reacción de hidrólisis alcalina, se añaden 2mL de cloroformo y 1mL de cloruro de sodio saturado para posteriormente proceder a la centrifugación de la muestra. La adición de cloruro de sodio saturado es necesaria, ya que permite la extracción de la fase inferior que contiene los hidroxiesteros con mínimo arrastre de material insoluble (McDonald y cols.,2012). En este caso, la adición de cloruro de sodio saturado mejoró el rendimiento de la extracción global en un 11% 25-hidroxicoolesterol y un 20% para 27-hidroxicoolesterol respecto a la no adición de la disolución de cloruro sódico saturado.

- *Extracciones seriadas*

Debido a la complejidad de la muestra y al elevado número de etapas, cada uno representaba una oportunidad para la pérdida de analitos. Mediante la inclusión de una segunda extracción se asegura un mayor rendimiento en esta etapa. Teniendo en cuenta la bibliografía se seleccionaron los tres disolventes más utilizados en estos casos: hexano (Honda y cols.,2008), diclorometano (McDonald y cols.,2012) y cloroformo (McDonald y cols.,2007). La Figura 3.5 muestra que los mejores resultados para ambos analitos se obtuvieron utilizando cloroformo, seguido de diclorometano y de hexano. La segunda extracción (el rendimiento para todos los disolventes se representa en una tonalidad más clara) resultó ser necesaria para ambos analitos, pero en el caso de 25-hidroxicolesterol, fue fundamental para obtener un rendimiento de 64%. El 27-hidroxicolesterol se extrajo mejor y se obtuvo 84%.

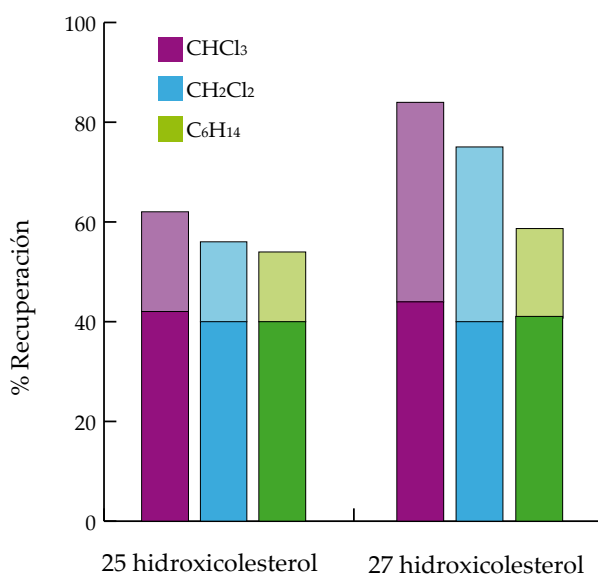


Figura 3.5. Rendimiento de las extracciones seriadas

4.2-PROCESO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

4.2.1-Elección de la fase estacionaria

El desarrollo del procedimiento de extracción en fase sólida consistió en la selección del cartucho comercial con el tipo de masa y fase estacionaria más adecuados, además de chequear las etapas de lavado y elución de los analitos en cuanto a tipo y volumen de disolventes utilizados en cada una.

Se siguió el procedimiento propuesto por los autores Lövgren-Sandblom y McDonald en 2007. Se comenzó utilizando cartuchos DSC-Si (500mg/3mL), Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los disolventes y volúmenes utilizados en cada etapa se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Protocolo de SPE para hidroxiesteroides utilizando fase normal (sílice)

Acondicionamiento	2 mL metanol
Equilibrado	2 mL hexano
Carga	1 mL extracto en tolueno
Lavado	1 mL hexano
Recuperación	8 mL hexano/isopropanol (7:3, v/v).

Para comprobar que este método resultaba eficaz se llevó a cabo un estudio de recuperación. Primero con disoluciones patrón y posteriormente con muestra dopada. Se preparó una disolución patrón de $1,5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25 y 27-hidroxicolesterol en tolueno. Se escogió esta concentración por ser la máxima que nos podemos encontrar de estos analitos en el hígado (Li-Hawkins y cols.,2000). Posteriormente, se acondicionó y equilibró el cartucho. Tras esto, se cargó 1mL de esta disolución y se recogió la fracción eluida. Se hizo lo mismo con la fracción de lavado y con la fracción de elución, la cual se recogió

mililitro a mililitro. Se realizó por separado hasta 10mL. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Todas las fracciones se cuantificaron por *LC/MS*. Se comprobó que en la etapa de carga en estas condiciones no se superaba el volumen de ruptura, definido como el máximo volumen de muestra que se puede procesar con una mínima pérdida de analito (1%). Tampoco se observaron pérdidas en la fracción de lavado. Las recuperaciones finales de los analitos fueron 119% para 25-hidroxicolesterol y 86% para 27-hidroxicolesterol.

Tras confirmar el buen comportamiento con patrones se comprobó el funcionamiento de los cartuchos utilizando una muestra real dopada. Se trabajó con 0,2g de hígado que siguieron el protocolo para hidroxiesteroles libres explicado en el apartado 3.4. La mezcla cloroformo/metanol (2:1, v/v) se dopó para ver al final 250ng·g⁻¹ de 25 y 27-hidroxicolesterol, ya que es la cantidad de analito que puede encontrarse libre en el hígado (Li-Hawkins y cols.,2000). Los ensayos se realizaron por triplicado. Las fracciones de recuperación se determinaron por *LC/MS*.

En esta ocasión, se observó una anomalía en los cromatogramas, en concreto en el canal en el que se registraba la *m/z* 367,3 correspondiente a 25-hidroxicolesterol, que se muestra en la Figura 3.6. La existencia de una banda al mismo tiempo de retención que la de este analito impedía cualquier cuantificación e indicaba la posibilidad de que hubiera otros compuestos desconocidos que podían estar coeluyendo. Los blancos de método realizados demostraron que la interferencia se generaba durante el tratamiento de

muestra con muestra real. No se había observado ninguna anomalía durante el trabajo con patrones.

Entonces se realizó una detección en modo SCAN y se vio el espectro que generaba ese pico a ese tiempo de retención. Se determinaron las composiciones elementales y se vio que los compuestos que estaban coeluyendo a ese tiempo compartían la misma fórmula molecular que los hidroxiesteros estudiados $C_{27}H_{46}O_2$.

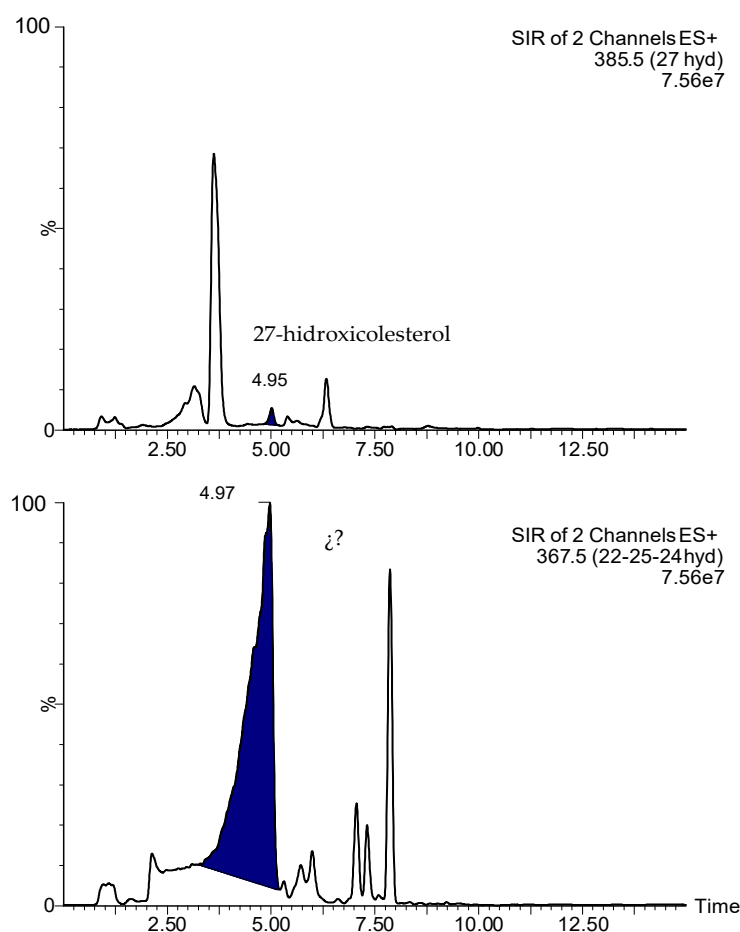


Figura 3.6. Cromatograma de una muestra de hígado tras el empleo de cartuchos de sílice

Una vez determinado que se trataba de compuestos de la misma familia, se ensayaron diferentes gradientes cromatográficos con la intención de resolver la coelución, pero no dio buenos resultados. Ni siquiera utilizando un gradiente isocrático durante 30 minutos se conseguían separaciones suficientes.

La conclusión que se alcanzó tras estos experimentos fue que la sílice de los cartuchos de *SPE* se estaba comportando como sustrato reactivo oxidando el colesterol presente en las muestras de hígado y como consecuencia, se generaban otros hidroxiesteroles que actuaban como interferencia. La sílice es un material higroscópico, y su comportamiento cromatográfico puede verse rápidamente afectado por la humedad del ambiente o por las condiciones de almacenamiento del cartucho una vez desempaquetado (McDonald y cols.,2012). Ni siquiera la adición de una mayor cantidad de BHT al principio del proceso pudo contrarrestar el problema. El problema de la oxidación del colesterol durante el proceso de análisis ya había sido descrito por diversos autores (Kudo y cols.,1989; Breuer y cols.,1995). Su experiencia demostró que el producto de oxidación más fácilmente formado es el 5,6(α/β) epoxicolesterol que posteriormente ha demostrado ser fisiológicamente irrelevante.

Tras este resultado se tomó la decisión de probar con otra fase estacionaria para el proceso de extracción en fase sólida. Se utilizaron cartuchos MFE®-PAK Amino.

Se procedió del mismo modo que en el apartado anterior, siguiendo el procedimiento propuesto por McDonald y colaboradores (McDonald y cols.,2012). Los disolventes empleados con esos cartuchos y los volúmenes utilizados en cada etapa se muestran en la Tabla 3.2 del apartado 3.5.

Para comprobar que este método también resultaba eficaz en el tratamiento de muestra planteado se llevó a cabo un estudio de recuperación. Primero con disoluciones patrón y posteriormente con muestra dopada. Se preparó una disolución patrón de $1,5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25 y 27-hidroxicolesterol en hexano. Posteriormente, se acondicionó y equilibró el cartucho. Tras esto, se cargó 1mL de esta disolución y se recogió la fracción eluida. Se hizo lo mismo con la fracción de lavado y con la fracción de elución, la cual se recogió cada mililitro por separado, para confirmar el volumen óptimo, hasta 8mL. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Se cuantificaron todas las fracciones por *LC/MS*. Se comprobó que en la etapa de carga en estas condiciones no se superaba el volumen de ruptura. Tampoco se observaron pérdidas en la fracción de lavado. Las recuperaciones finales de los analitos fueron 86% para 25-hidroxicolesterol y 90% para 27-hidroxicolesterol. Tras este estudio, se comprobó el funcionamiento de los cartuchos utilizando una muestra real dopada. Se trabajó con 0,2g de hígado que siguieron el protocolo para hidroxiesteros libres explicado en el apartado 3.4. La mezcla cloroformo/metanol (2:1, v/v) se dopó para ver al final $250\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25 y 27-hidroxicolesterol. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las fracciones de recuperación se determinaron por *LC/MS* Los resultados de

recuperación en esta etapa fueron 102% para 25-hidroxicolesterol y 75% para 27-hidroxicolesterol.

Este procedimiento de *SPE* ha resultado ser simple y robusto para efectuar la separación de esteroides de otros compuestos y ha permitido procesar muchas muestras con resultados consistentes. El procedimiento consigue ser selectivo para los hidroxiesteroides. A continuación se resumen los principales motivos de su buen funcionamiento:

Como ya se ha explicado, durante la etapa de hidrólisis alcalina se produce la rotura de las cadenas de ácidos grasos de las principales clases de lípidos (triglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, ésteres de colesterol). Por ello se generan cantidades significativas de ácidos grasos a niveles de concentración mucho mayores que los de los hidroxiesteroides, que deben ser eliminados para eliminar complicaciones posteriores en el análisis. Por este motivo, los compuestos no polares y neutros se eluyen primero del cartucho usando hexano (etapa de lavado). Los esteroides incluyendo los hidroxiesteroides, más polares, se eluyen utilizando 4mL de cloroformo/metanol (23:1, v/v). Lo que se consigue con esta combinación de disolventes es no eluir los ácidos grasos que quedan retenidos en la fase estacionaria, gracias a esa pequeña interacción electrostática que establecen los cartuchos de fase amino con los ácidos grasos, que requieren disolventes de elución más fuertes como metanol/ácido acético (95:5, v/v) (McDonald y cols.,2012). Finalmente es muy importante ajustar las condiciones de vacío del sistema para que haya un flujo uniforme de 1-2 gotas por segundo y evitar interrupciones durante el desarrollo del proceso.

4.2.2-Preparación de la muestra final

Los 4mL recuperados se llevaron a sequedad utilizando una corriente de N₂, la evaporación se realizó en un baño a 40°C. La redisolución del extracto final purificado de la *SPE* es un paso importante y debe hacerse con atención. Se ensayaron varios disolventes para disolver el extracto antes de la inyección en el cromatógrafo. Las mezclas ensayadas fueron: metanol/agua Milli-Q (9:1,v/v); metanol/agua Milli-Q (95:5,v/v) y metanol. Experimentalmente se comprobó que disolviendo la muestra en 300μL (0,2g) de metanol/agua Milli-Q (9:1,v/v) seguido de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente en un baño de ultrasonidos daba los mejores resultados. Esto es debido a que el colesterol, que sigue siendo el compuesto más abundante en el extracto final, está presente a niveles de concentración mil veces superiores a los hidroxiesteros. Se puede aprovechar la baja solubilidad que tiene el colesterol en disolventes como metanol, para hacer una redisolución selectiva del extracto y tenerlo en un disolvente adecuado para los hidroxiesteros. Esta baja solubilidad se puede acentuar cuando se añade agua al metanol y además contribuye a obtener mejores picos cromatográficos para los hidroxiesteros.

En el caso de las muestras de hígado procesadas con el método de hidroxiesteros libres se observó que tenían más cantidad de material lipídico y por tanto también más cantidad de colesterol. En este punto hubiera resultado necesaria la filtración de la muestra con un filtro de 0,22μm.

Este paso acarreaba el riesgo de perder parte de la muestra final y debido al poco volumen disponible, se probó a centrifugar la muestra a 1500rpm y se comprobó que la muestra se clarificaba, pudiendo ser recuperada en su totalidad, descartando el material insoluble que quedaba adherido a las paredes del tubo de vidrio.

4.3-ANÁLISIS POR LC/MS

4.3.1-Selección del modo de ionización

La ionización por electrospray (*ESI*) es un método ampliamente aplicado a compuestos polares en un amplio rango de pesos moleculares. Sin embargo la ionización química a presión atmosférica (*APCI*) es aplicable a compuestos más apolares. Dado que los hidroxiesteros poseen características polares pero también cuentan con una estructura carbonada rígida que les otorga propiedades apolares (Rossmann y cols.,2007). Se realizaron pruebas con ambas interfases, ambas en modo positivo. Para la comprobación, se utilizó una disolución patrón que contenía 600ng·g⁻¹ de 25 y 27-hidroxicolesterol en metanol/agua Milli-Q (9:1,v/v). Las señales obtenidas en modo *ESI* superaban en más de un orden de magnitud a las obtenidas con *APCI*. Por eso se trabajó en *ESI*. La Figura 3.7 muestra los resultados de las señales obtenidas.

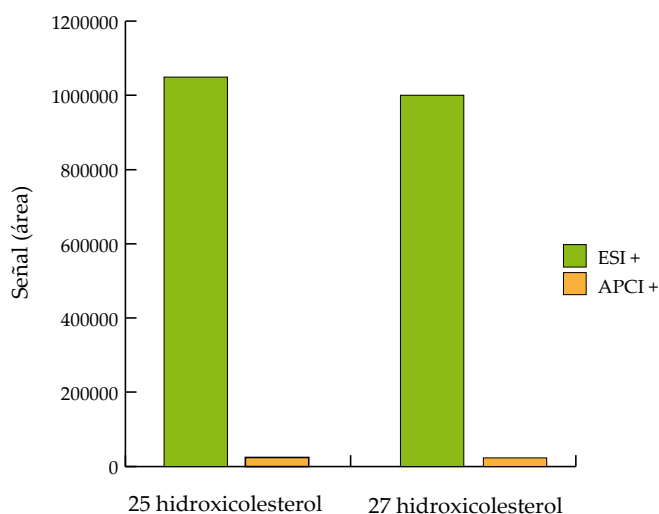


Figura 3.7. Comparación entre las señales obtenidas utilizando *ESI* ó *APCI*

4.3.2-Separación de isómeros de posición

Desde el comienzo del trabajo se tuvo en cuenta que el 25 y el 27-hidroxicolesterol eran isómeros de posición ya que sólo se diferencian en la situación del grupo -OH en su cadena lateral. Para comenzar el estudio se comenzó realizando la perfusión de los analitos. Para ello, se utilizó una disolución de cada analito de $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol. Las condiciones del espectrómetro de masas utilizadas se mostraron en la Tabla 3.3.

La masa molecular de ambos compuestos es 402,6, se observó que ambos compuestos tenían las mismas m/z , pero con diferentes intensidades de señal. Así, para el 25-hidroxicolesterol la m/z con mayor señal era 367,3 correspondiente a la ganancia de un protón y a la pérdida de dos moléculas de agua $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, y para 27-hidroxicolesterol la m/z con mayor señal era 385,3, correspondiente a la ganancia de un protón y pérdida de una molécula

de agua $[M+H-H_2O]^+$. Además, en el caso del 25-hidroxicolesterol el aducto de sodio $[M+Na]^+$ con m/z 425,3 daba la mayor señal pero no se trabajó con esa m/z porque nunca se observó pico al realizar la cromatografía. En la Figura 3.8 se muestran la estructura de los analitos y los resultados de la perfusión.

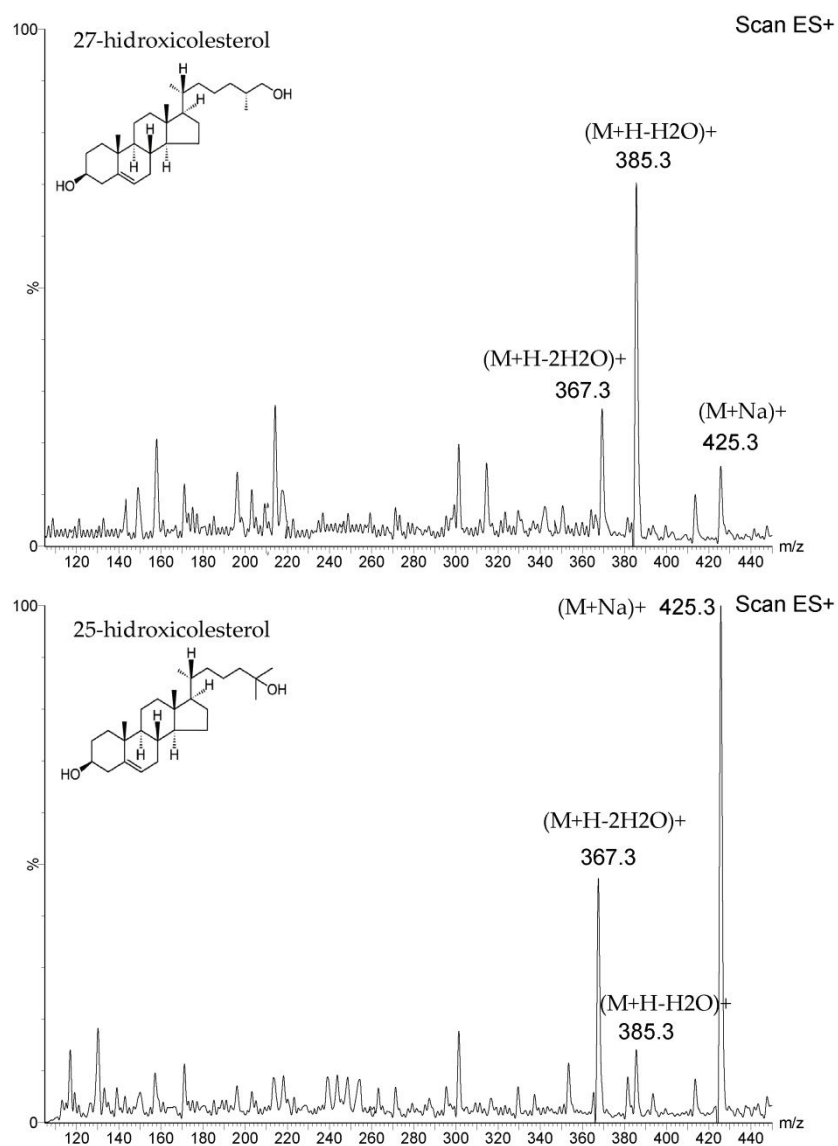


Figura 3.8. Espectros y estructura de 25 y 27-hidroxicolesterol

Esta diferencia entre las intensidades de m/z , suponía una ventaja pero no era suficiente para diferenciar a ambos compuestos y asegurar su correcta integración y cuantificación. Era necesario separarlos también en la columna optimizando el gradiente cromatográfico.

4.3.3-Elección de la fase móvil

La elección de la fase móvil se realizó en base a dos objetivos: el primero fue conseguir la máxima separación entre los compuestos que son isómeros de posición y el segundo obtener intensidades de señal adecuadas para el nivel de concentración de los hidroxiesteros en hígado.

Algunos métodos para determinar hidroxiesteros, emplean acetonitrilo como componente de la fase móvil (Burkard y cols.,2004; McDonald y cols.,2012; Xu y cols.,2013) y también la combinación metanol con agua (McDonald y cols.,2007; Helmschrodt y cols.,2013).

En este estudio, se probaron dos fases móviles diferentes: En primer lugar se probó una fase móvil cuya composición era acetonitrilo-isopropanol (7:3 v/v) con 5mM NH_4OAc en el reservorio A y acetonitrilo-agua Milli-Q (5:5 v/v) con 5mM NH_4OAc en el reservorio B. Se optimizó el gradiente cromatográfico. Las pruebas se realizaron con una disolución patrón que contenía $600\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25 y 27-hidroxicoolesterol en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v). En estas condiciones se consiguió una buena separación para ambos analitos. El tiempo de retención para el 25-hidroxicoolesterol fue 7,96 minutos y para 27-hidroxicoolesterol 8,73 minutos. La diferencia entre ambos compuestos

era de casi un minuto, el doble que las conseguidas por otros autores para estos mismos compuestos con fases móviles con acetonitrilo-isopropanol (McDonald y cols.,2012) pero la intensidad de la señal no resultaba adecuada.

El fenómeno de la disminución de la señal cuando se incorpora acetonitrilo a las fases móviles ya ha sido documentado (Lawrence y cols.,2006; McDonald y cols.,2007). La explicación se debe a que el acetonitrilo no fomenta la formación del ion $[M+H-H_2O]^+$ ó $[M+H-2H_2O]^+$ cuando se usa ionización *ESI*. Por este motivo, se decidió probar con otra fase móvil, pese a haber conseguido buena separación entre los compuestos.

Esta vez, se utilizó metanol con ácido fórmico 0,1% (v/v) en el reservorio A y agua Milli-Q con ácido fórmico 0,1% (v/v) en el reservorio B. Como en el caso anterior, se optimizó el gradiente cromatográfico. Las pruebas se realizaron con una disolución patrón que contenía $600\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25 y 27-hidroxicolesterol en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v). Se observó que utilizando esta fase móvil la resolución no era tan buena en comparación con la fase móvil anterior. El tiempo de retención para el 25-hidroxicolesterol fue 4,43 minutos y para 27-hidroxicolesterol 4,75 minutos, pero la intensidad de la señal era 40 veces superior. Por este motivo, se seleccionó esta fase móvil y se trabajó en encontrar un buen gradiente cromatográfico. A pesar de que trabajar en modo isocrático pudiera resultar lo más conveniente en estas situaciones (Uomori y cols.,1987) se prefirió un gradiente suave para evitar el ensanchamiento de los picos.

La diferencia de intensidad y las diferentes separaciones entre los picos se puede observar en la Figura 3.9 donde se muestra el resultado obtenido para cada fase móvil.

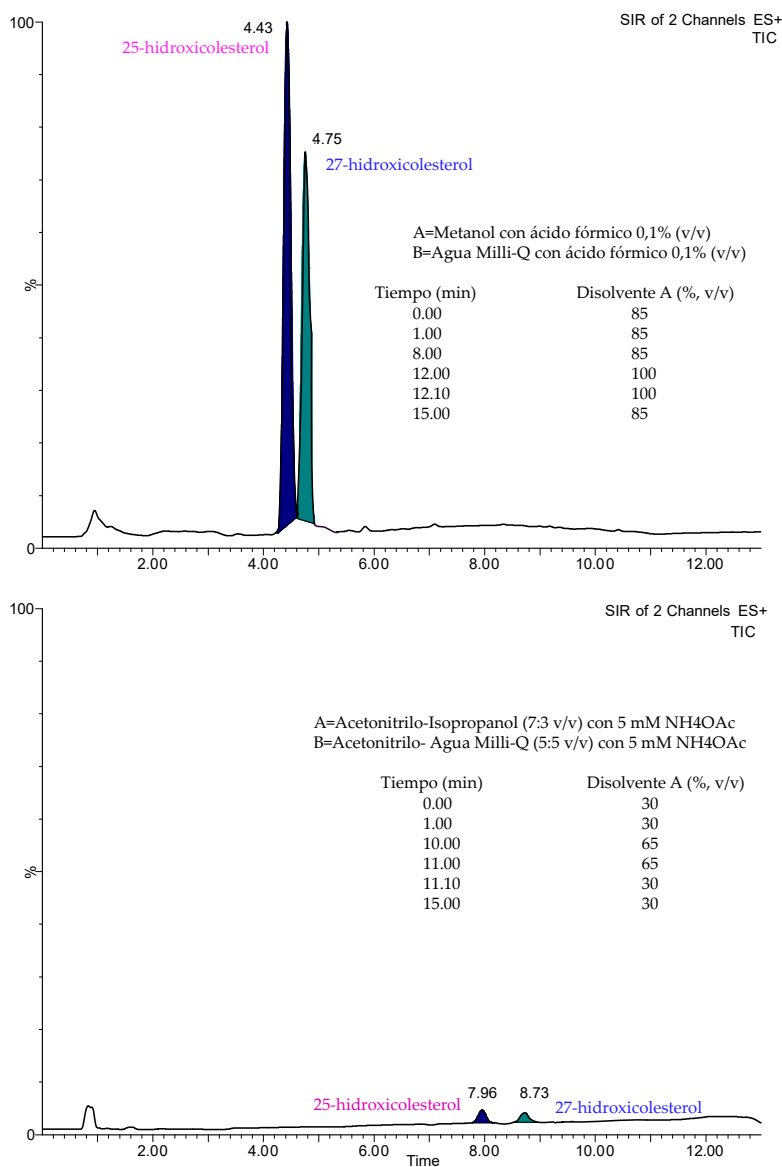


Figura 3.9. Comportamiento de los hidroxiesteros ante una fase móvil con metanol-agua o acetonitrilo-isopropanol

4.3.4-*SIR* vs *MRM*

Tratándose de analitos en muestras biológicas, se exploró una detección más selectiva mediante el modo *MRM* que pudiera proporcionar una mayor selectividad. Se determinaron los valores de las transiciones *m/z* por perfusión de una disolución de cada analito de $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol. Posteriormente, se inyectó una muestra preparada siguiendo el protocolo del apartado 3.4. Se determinó el valor de la relación señal/ruido (*S/R*) de los picos obtenidos para ambos modos de detección *SIR* y *MRM*. Los resultados se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5.Comparacion entre detecciones en modo *SIR* y *MRM* según la relación *S/R*

Compuesto	tr (min)	<i>SIR</i>			<i>MRM</i>		
		<i>m/z</i>	<i>V</i> cono	<i>S/R</i>	<i>m/z</i>	<i>V</i> colision	<i>S/R</i>
25-OHl	4.43	367.3	35	1590	367.3►147.1	40	140
27-OH	4.75	385.3	35	1819	385.3►161.1	30	409

Para el modo *SIR* los valores de la relación señal/ruido (*S/R*) resultaron ser mejores que para el modo *MRM*. La explicación puede encontrarse en que los hidroxiesteros comparten un patrón de fragmentación común cuando se trabaja en modo *MRM*. Los sitios de ruptura predominantes del anillo de la molécula de esteroles se encuentran entre los átomos de carbono 11-12, 12-13, y de 8 a 14 (Rossmann y cols.,2007). La desventaja es que se rompen en múltiples fragmentos en la celda de colisión (incluso utilizando voltajes suaves) ocasionando una acusada pérdida de sensibilidad que no resultó adecuada para este caso. Por este motivo se seleccionó el modo *SIR* para la determinación de los hidroxiesteros.

4.4-PARÁMETROS ANALÍTICOS

4.4.1-Hidroxiesteroides libres

Una vez adaptado y optimizado el método a la determinación de 25 y 27-hidroxicolesterol libres en hígado, se procedió al cálculo de los parámetros analíticos del mismo. Se determinó la curva de calibrado y el rango lineal, los límites de detección y cuantificación, la repetibilidad, la precisión intermedia, la eficacia global del proceso y la exactitud. Finalmente, se hizo un estudio de la estabilidad de la muestra tras ser procesada. Los resultados se resumen en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Parámetros analíticos del método para hidroxiesteroides libres

	25- OH	27- OH
Coeficiente de correlación (r^2)	0,994	0,999
Intervalo lineal ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	88-770	91-880
Límite de detección ($\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$)	15	304
Límite de cuantificación ($\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$)	50	1013
Repetibilidad (% , n=6)	7	8
Precisión intermedia (% , n=3)	15	21
Eficacia del proceso (% , n=3)	102	70
Exactitud (% , n=3)	-2	30

Las curvas de calibrado para ambos analitos resultaron ser lineales en dos órdenes de magnitud con coeficientes de regresión que oscilaron entre 0,994 para 25-hidroxicolesterol y 0,999 para 27-hidroxicolesterol. Se calcularon los límites de detección y cuantificación siendo 15 y 304 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ para 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol respectivamente. Los límites de cuantificación fueron 50 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ para 25-hidroxicolesterol y 1 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para 27-hidroxicolesterol. Los valores de repetibilidad resultaron ser 7% y 8% para 25-

hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol respectivamente, adecuados para este tipo de muestras biológicas y el nivel de concentración de $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (Rambla-Alegre y cols.,2012). La precisión intermedia fue del 15% para 25-hidroxicolesterol y 21% para 27-hidroxicolesterol.

El tratamiento de muestra fue optimizado hasta conseguir que los efectos matriz fueron casi inexistentes para 25-hidroxicolesterol (3%) y 15% para 27-hidroxicolesterol. Este cálculo se realizó teniendo en cuenta la concentración endógena de analitos del hígado. Los valores del rendimiento de extracción resultaron ser superiores al 90% en ambos casos. Estos dos parámetros dieron resultados satisfactorios, debido en parte también al uso de un estándar interno deuterado como fue el 25-hidroxicolesterol-26,26,26,27,27,27 (d_6). Su similitud con los analitos hace que pueda corregir bien las imprecisiones que acarrea cada paso: tratamiento de muestra, cromatografía y detección (concretamente en la ionización) porque presenta un comportamiento parecido a los hidroxiesteros (Ismaiel y cols.,2008).

Tras comprobar que los efectos matriz y el rendimiento de extracción del proceso estaban dentro de los límites esperados para el método, se calculó la eficacia del proceso. Estos valores fueron 102% y 70% para 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol respectivamente.

4.4.2-Hidroxiesteros totales

Una vez adaptado y optimizado el método para la determinación de 25 y 27-hidroxicolesterol totales en hígado, se procedió al cálculo de los

parámetros analíticos de la misma manera que para el método de los hidroxiesteros libres. Se determinó la curva de calibrado y el rango lineal, los límites de detección y cuantificación, la repetibilidad, la precisión intermedia, la eficacia global del proceso y la exactitud. Los resultados se resumen en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Parámetros analíticos del método para hidroxiesteros totales

	25- OH	27- OH
Coefficiente de correlación (r^2)	0,995	0,996
Intervalo lineal ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	12-345	74-140
Límite de detección ($\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$)	12	15
Límite de cuantificación ($\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$)	40	49
Repetibilidad ($\%$, $n=6$)	2	7
Precisión intermedia ($\%$, $n = 3$)	26	23
Eficacia del proceso ($\%$, $n=3$)	66	94
Exactitud ($\%$, $n=3$)	34	6

Las curvas de calibrado para ambos analitos resultaron ser lineales en dos órdenes de magnitud con coeficientes de regresión que oscilaron entre 0,995 para 25-hidroxicolesterol y 0,996 para 27-hidroxicolesterol. Los límites de detección estuvieron en el rango de los $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ siendo 12 y 15 para 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol respectivamente. Los límites de cuantificación fueron $40\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ para 25-hidroxicolesterol y $49\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para 27-hidroxicolesterol. Los valores de repetibilidad resultaron ser en ambos casos menores del 10 %. La precisión intermedia fue del 26% para 25-hidroxicolesterol y 23% para 27-hidroxicolesterol. Este valor es ligeramente superior al obtenido con el método para hidroxiesteros libres. Este hecho podría explicarse por el mayor número de pasos existentes en el tratamiento de muestra. La eficacia del proceso resultó ser 66% para 25-hidroxicolesterol y 94% para 27-hidroxicolesterol. En este caso el 25-hidroxicolesterol dio valores

peores que en el método para hidroxiesteros libres, observándose el comportamiento inverso para el 27-hidroxicolesterol. Esta diferencia puede ser debida a la diferente distribución de los esteres de los hidroxiesteros en el hígado ya que el 25-hidroxicolesterol se encuentra predominantemente en forma libre y el 27-hidroxicolesterol en su forma esterificada (Li-Hawkins y cols.,2000).

4.4.3-Estudios de estabilidad

Durante la optimización del método y la determinación de las muestras, el hígado estuvo almacenado en un congelador a -80 °C. Durante una semana, se realizaron análisis de un pool de hígado *KO* y de un pool de hígado *WT*. Este pool se componía de tres trozos tomados de diferentes zonas del hígado de partida. El hígado sufrió ciclos de congelación-descongelación cada día de la semana. No se observaron cambios significativos en los niveles de concentración de los analitos entre los pools de cada tipo de hígado: *KO* y *WT*. Se comenzó viendo la estabilidad de los patrones de hidroxiesteros en disolución. Los estudios de estabilidad de los analitos en la muestra una vez procesada informaron de un tiempo de estabilidad de dos semanas sin que se observaran diferencias en las concentraciones determinadas para cada analito en la muestra procesada. Estas muestras siempre se conservaron a -20°C.

4.5-CUANTIFICACIÓN DE HIDROXIESTEROLES

4.5.1-Ayuno largo

- *Hidroxiesteroles libres*

La Tabla 3.8 muestra las concentraciones de hidroxiesteroles libres en condiciones de ayuno largo para animales *KO* y *WT*.

Tabla 3.8. Concentraciones de hidroxiesteroles libres en condiciones de ayuno

AYUNO		CONCENTRACIÓN LIBRE	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·g ⁻¹)	27-OH (ng·g ⁻¹)
223	KO	137	89
228	KO	122	111
229	KO	137	97
231	KO	131	84
250	KO	171	96
235	WT	32	191
236	WT	29	140
239	WT	30	179
249	WT	43	101
260	WT	37	87
$\mu \pm \sigma$ (KO)		140 \pm 19	95 \pm 10
$\mu \pm \sigma$ (WT)		34 \pm 6	140 \pm 46
KO/WT		4	0,7

Puede observarse que la concentración de 25-hidroxicolesterol en ratas *KO* es cuatro veces superior al de las ratas *WT*, lo que indica que el gen *Cyp7b1*, no está realizando su función en la ruta metabólica provocando acúmulo del sustrato. En el caso del 27-hidroxicolesterol no se observa casi variación en la concentración libre entre animales *KO* y *WT*.

Posteriormente, con los datos obtenidos se realizó un test no paramétrico Mann-Whitney de dos colas, estableciendo el nivel de significación a $p < 0,05$. Se concluyó con un nivel de confianza del 95%, ($p = 0,002 < 0,05$) que hay diferencias significativas entre los animales KO y WT para el caso del 25-hidroxicolesterol. Sin embargo, la prueba de significancia no encontró diferencias entre KO y WT ($p = 0,15 > 0,05$) para 27-hidroxicolesterol.

Esto indicaría que el sustrato preferido de la enzima codificada por el gen *Cyp7b1*, sería el 25-hidroxicolesterol más que el 27-hidroxicolesterol. Este hecho ha sido sugerido por algunos autores (Cui y cols.,2013). También es importante destacar que estos metabolitos son generados normalmente por una enzima concreta y utilizados por otra, y que en algunos casos patológicos pueden existir diversos mecanismos de compensación a través de vías metabólicas alternativas todavía desconocidas a través de las cuales podrían estar contrarrestando su exceso. La Figura 3.10, A y B recoge la concentración media con las desviaciones estándar para cada y para cada grupo de animales.

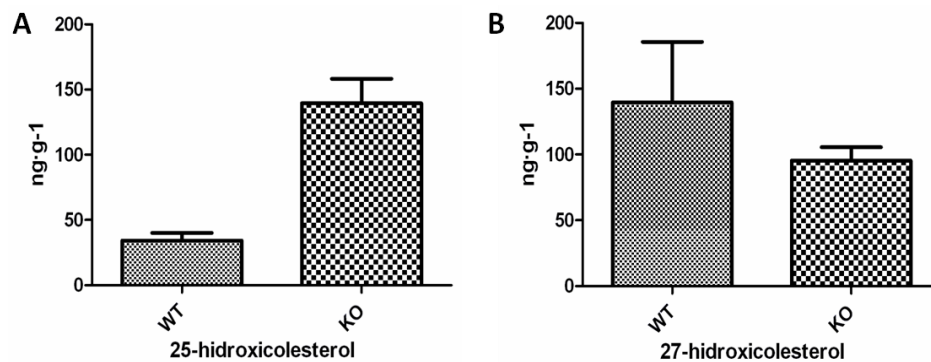


Figura 3.10. Concentración de hidroxiesteros libres en hígado en situación de ayuno largo. A) 25-hidroxicolesterol libre en hígado, B) 27-hidroxicolesterol libre en hígado

- *Hidroxiesteroles totales*

Debido a la diferente distribución de las formas libres y esterificadas que presentan los hidroxiesteroles en los diferentes tejidos. Era importante conocer la concentración total de ambos analitos en hígado en condiciones de ayuno largo. Se sabe que en el hígado de ratón, especie más próxima a la rata, de la que se conoce esta distribución, el 25-hidroxicolesterol se encuentra casi por completo en su forma libre, mientras que el 27-hidroxicolesterol se presenta en mayor porcentaje, en su forma esterificada (Li-Hawkins y cols.,2000).

La Tabla 3.9 muestra las concentraciones de hidroxiesteroles totales en condiciones de ayuno largo para animales *KO* y *WT*

Tabla 3.9. Concentraciones de hidroxiesteroles totales en condiciones de ayuno

AYUNO		CONCENTRACIÓN TOTAL	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·g ⁻¹)	27-OH (ng·g ⁻¹)
223	KO	147	191
228	KO	142	267
229	KO	116	111
231	KO	132	199
250	KO	*	*
235	WT	58	156
236	WT	43	129
239	WT	31	195
249	WT	48	53
260	WT	73	157
$\mu \pm \sigma$ (KO)		134 \pm 14	192 \pm 64
$\mu \pm \sigma$ (WT)		50 \pm 16	160 \pm 26
KO/WT		~3(2,68)	~1(1,2)

*Cantidad de muestra necesaria no disponible

En este caso, para 25-hidroxicolesterol, se concluyó con un nivel de confianza del 95%, ($P=0,0016<0,05$) que hay diferencias significativas entre los animales *KO* y *WT*. Puede observarse, que la concentración de 25-hidroxicolesterol en ratas *KO* es tres veces superior al de las ratas *WT*, lo que confirma el mal funcionamiento del gen *Cyp7b1*. Puede verse también, que este mal funcionamiento repercute en la concentración total. La concentración total de 25-hidroxicolesterol en las ratas *KO* es muy parecido al libre, por lo que estos animales enfermos no esterifican el compuesto. En el caso del 27-hidroxicolesterol parece invertirse la tendencia respecto a la forma libre, porque la concentración total de *KO* es mayor que *WT*. Esto sugeriría que tampoco se estaría metabolizando 27-hidroxicolesterol pero, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ($P=0,4857>0,05$) entre animales *KO* y *WT*. Los resultados pueden verse en la Figura 3.11.

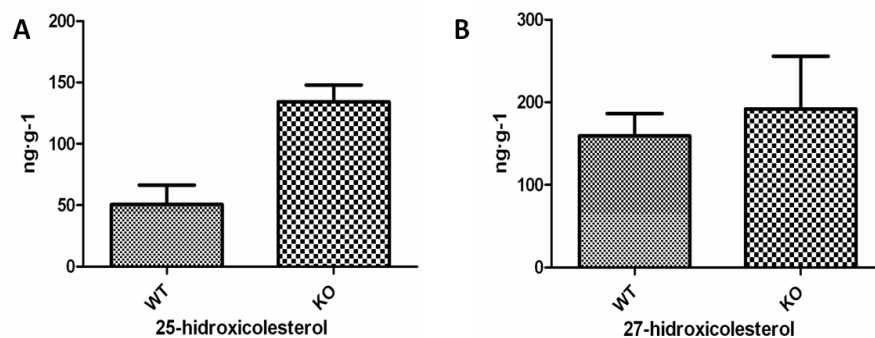


Figura 3.11. Concentración de hidroxiesteroides totales en hígado en situación de ayuno largo.
A) 25-hidroxicolesterol total en hígado B) 27-hidroxicolesterol total en hígado

- *Esterificación*

Desde el punto de vista del metabolismo de los esteroides, la esterificación de estos analitos en los tejidos puede ser un paso necesario para su absorción y transporte. Como se explicó en la introducción general, la esterificación de esteroides es uno de los procesos necesarios que conducen a la formación de las lipoproteínas, en las cuales están en su mayoría en la forma de éster (Lin y cols.,2010). Esto supone que la distribución entre las formas libres y las esterificadas de ambos analitos proporciona información sobre su transporte y movilización en el organismo. Esta distribución puede verse en la Figura 3.12.

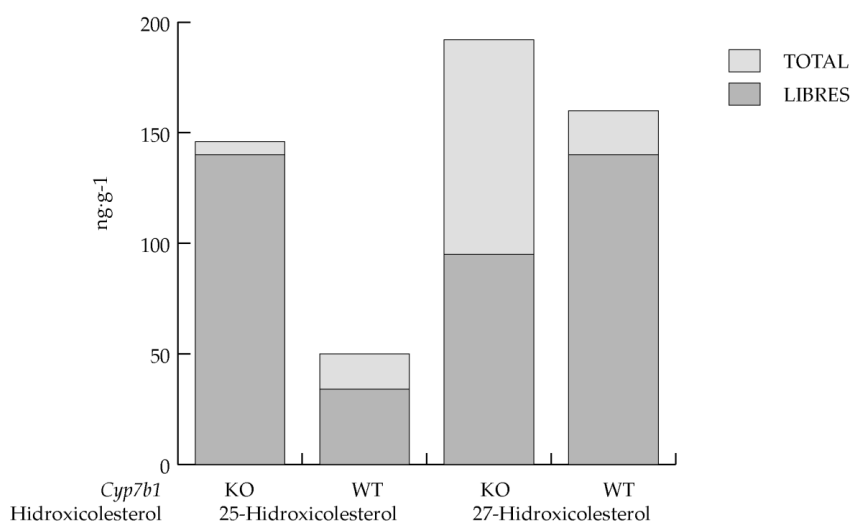


Figura 3.12. Distribución de los hidroxiesteroides libres y esterificados en el tejido hepático en condiciones de ayuno

Puede observarse que solamente el 4% del 25-hidroxicolesterol se encuentra esterificado en el hígado de los animales *KO*, sin embargo este nivel alcanza el 32% en el de los *WT*.

En el caso del 27-hidroxicolesterol, en los animales *KO* la mitad de la concentración total está libre y la otra mitad esterificado, lo que sugiere que ese exceso de este analito estaría preparándose para ser movilizado hacia otras partes del organismo. En los animales *WT* el 27-hidroxicolesterol solo está esterificado al 13%, lo que contrasta con lo encontrado en bibliografía para ratones, en el que casi en su totalidad (95%) del 27-hidroxicolesterol se encuentra esterificado (Li-Hawkins y cols.,2000).

4.5.2-Postprandial

- *Hidroxiesteroles libres*

Como se explicó anteriormente, la mayoría de las veces los análisis clínicos se realizan en condiciones de ayuno. Estos resultados, podrían no reflejar la situación real del organismo y por ello se sugiere la realización de análisis postprandiales. Por este motivo, ambos tipos de animales *KO* y *WT*, se estudiaron tras la ingesta de 5mL de aceite de oliva virgen extra. Esta cantidad representa el uso de una dosis de 16mL de aceite de oliva/kg, suficiente para inducir una respuesta postprandial en ratas (Martinez-Beamonte y cols.,2013).

La Tabla 3.10 muestra las concentraciones de hidroxiesteroles libres en condiciones postprandiales. Puede verse que el valor del animal 62 para 25-hidroxicolesterol, resultó ser un outlier tras aplicarle la prueba Q de Dixon (Miller,2002), $Q=0,9 > 0,598=Q_{\text{tabla}}$ con un nivel de confianza del 99%.

Tabla 3.10. Concentraciones de hidroxiesteroles libres en condición postprandial

POSTPRANDIAL		CONCENTRACIÓN LIBRE	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·g ⁻¹)	27-OH (ng·g ⁻¹)
33	KO	185	96
35	KO	385	121
36	KO	226	131
40	KO	180	111
48	KO	236	153
49	KO	176	101
64	KO	209	72
65	KO	331	105
72	KO	68	66
76	KO	43	131
89	KO	120	96
92	KO	235	124
94	KO	202	42
95	KO	171	44
62	WT	231	182
78	WT	38	48
111	WT	26	95
112	WT	30	120
117	WT	45	204
119	WT	40	162
120	WT	37	144
121	WT	30	131
$\mu \pm \sigma$ (KO)		198 \pm 90	99 \pm 33
$\mu \pm \sigma$ (WT)		35 \pm 7	136 \pm 50
KO/WT		~6(5,7)	~1(0,73)

Se puede observar que la concentración aumenta para *KO* (1,5 veces más que en ayuno), mientras que en *WT* se mantiene casi sin cambios.

Para 25-hidroxicolesterol, el test Mann-Whitney dio diferencias significativas entre los animales *KO* y *WT* ($p=0,002<0,05$). Puede verse que la concentración de 25-hidroxicolesterol en ratas *KO* es seis veces superior respecto de las ratas *WT*. Todo esto refuerza la conclusión de que el gen *Cyp7b1* no está realizando su función en la ruta metabólica y por eso se acumula 25-hidroxicolesterol. Además, los estudios postprandiales muestran

como el metabolismo se moviliza tras la ingesta de alimentos lo que provoca que aumenten las diferencias entre animales enfermos y sanos.

El 27-hidroxicolesterol siguió la misma tendencia que la observada para las pruebas en ayuno. La prueba de significancia no encontró diferencias entre KO y WT ($p=0,08>0,05$). Los resultados se muestran en la Figura 3.13.

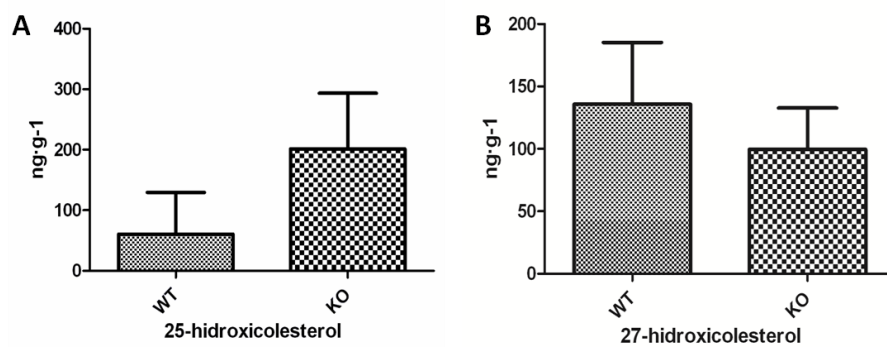


Figura 3.13. Concentración de hidroxiesteros libres en hígado en situación postprandial. A) 25-hidroxicolesterol libre en hígado, B) 27-hidroxicolesterol libre en hígado

- *Hidroxiesteros totales*

Se puede ver, que la concentración total de 25-hidroxicolesterol en las ratas KO es muy parecida al libre, por lo que estos animales enfermos no esterifican al compuesto. Pero no ocurre lo mismo en el caso del 25-hidroxicolesterol de los animales WT en los que la concentración total del compuesto es 1,5 veces superior al libre. Es por ello que la ratio KO/WT de 25-hidroxicolesterol en ratas KO es cuatro en vez de seis, como ocurría con el analito libre. La Tabla 3.11 muestra las concentraciones de hidroxiesteros libres en condiciones postprandiales.

Tabla 3.11. Concentraciones de hidroxiesteroles totales en condición postprandial

POSTPRANDIAL		CONCENTRACIÓN TOTAL	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·g ⁻¹)	27-OH (ng·g ⁻¹)
33	KO	*	*
35	KO	528	98
36	KO	218	92
40	KO	241	94
48	KO	*	*
49	KO	191	203
64	KO	162	85
65	KO	*	*
72	KO	78	124
76	KO	72	140
89	KO	*	*
92	KO	197	34
94	KO	210	56
95	KO	116	141
62	WT	157	136
78	WT	251	82
111	WT	53	107
112	WT	42	189
117	WT	47	247
119	WT	49	106
120	WT	65	54
121	WT	*	*
$\mu \pm \sigma$ (KO)		165 \pm 22	107 \pm 48
$\mu \pm \sigma$ (WT)		51 \pm 8	132 \pm 66
KO/WT		~3(3,23)	~1(0,8)

*Cantidad de muestra necesaria no disponible

Puede verse que el valor del animal 35 para 25-hidroxicolesterol, resultó ser un outlier tras aplicarle la prueba Q de Dixon, $Q=0,62 > 0,568=Q_{\text{tabla}}$ con un nivel de confianza del 99%.

El test Mann-Whitney concluyó con un nivel de confianza del 95% ($p=0,002 < 0,05$) que para 25-hidroxicolesterol hay diferencias significativas entre KO y WT. Y puede verse como la concentración total de 25-hidroxicolesterol casi no difiere de la libre para los animales KO.

Sin embargo el contenido total de 25-hidroxicolesterol es 1,5 veces superior al libre en animales *WT*. Para el caso de 27-hidroxicolesterol, no se observaron diferencias significativas ($p=0,30>0,05$) entre los animales *KO* y *WT*. Tampoco se observaron diferencias significativas entre la concentración libre y total. Con lo que podría concluirse que la situación postprandial no estaría afectando a la producción de 27-hidroxicolesterol ni a su movilización en el organismo. Los resultados se muestran en la Figura 3.14.

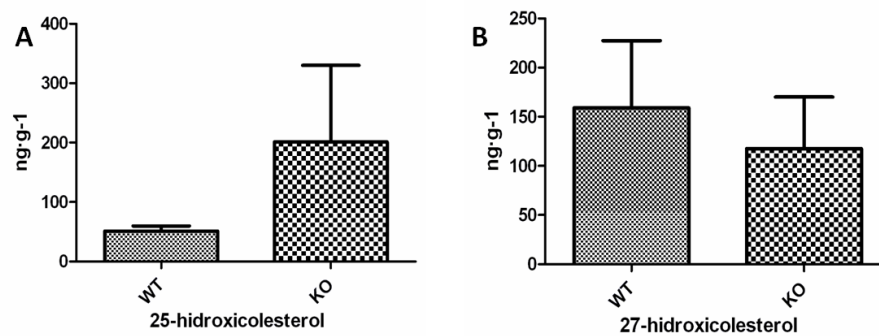


Figura 3.14. Concentración de hidroxiesteros totales en hígado en situación postprandial. A) 25-hidroxicolesterol total en hígado, B) 27-hidroxicolesterol total en hígado

- *Esterificación*

En esta situación postprandial puede observarse que el mayor porcentaje de esterificación lo presenta el 25-hidroxicolesterol en el hígado de los animales *WT*, donde este nivel alcanza el 32%. Sin embargo, para el resto de los casos, este nivel no llega ni al 10%. Esta situación era esperable para 25-hidroxicolesterol ya que coincide con lo encontrado en la bibliografía (Li-Hawkins y cols., 2000).

Las diferencias son más marcadas para 27-hidroxicolesterol ya que, según la bibliografía, en situación de ayuno este compuesto se encuentra esterificado al 50% (Robins y cols.,1999).

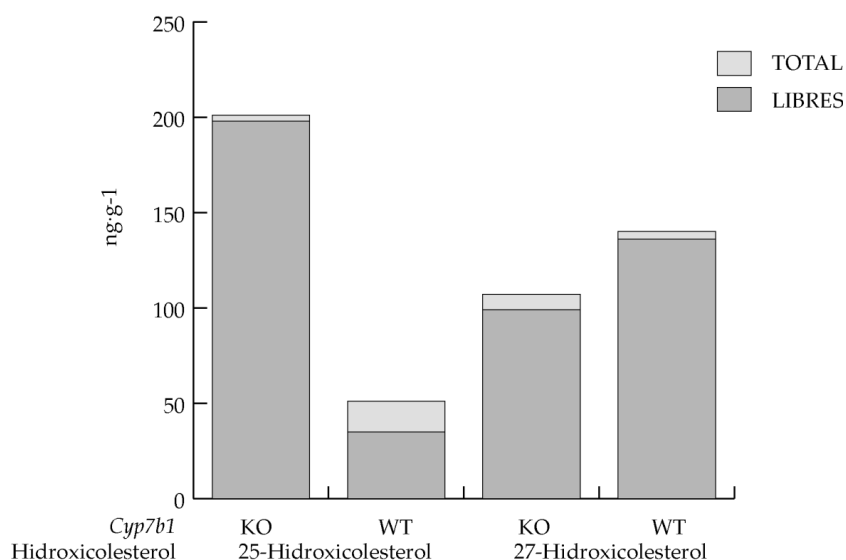


Figura 3.15. Distribución de los hidroxiesteros libres y esterificados en el tejido hepático en condiciones postprandiales.

4.5.3-Plásmido

- *Hidroxiesteros libres*

Se calculó la concentración de ambos hidroxiesteros para seis animales *KO* que sirvieron como control del experimento, como se puede ver en la Tabla 3.12, los valores resultaron similares a los obtenidos para ratas *KO* en condiciones de ayuno largo.

Tabla 3.12. Concentraciones de hidroxiesteroles libres en condición de ayuno en ratas plásmido

PLÁSMIDO		CONCENTRACIÓN LIBRE	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·g ⁻¹)	27-OH (ng·g ⁻¹)
373	KO,control	168	140
374	KO,control	201	327
375	KO,control	157	139
385	KO,control	53	311
386	KO,control	167	145
387	KO,control	36	79
382	KO,plásmido	30	72
383	KO,plásmido	36	177
388	KO,plásmido	167	310
392	KO,plásmido	210	130
393	KO,plásmido	202	144
397	KO,plásmido	180	42
$\mu \pm \sigma$ control		130 \pm 68	190 \pm 103
$\mu \pm \sigma$ plásmido		137 \pm 82	146 \pm 94
KO,control/KO,plásmido		1	1,5

La prueba Mann-Whitney no encontró diferencias significativas ($p=0,69>0,05$) entre los animales KO, control y KO, plásmido para 25-hidroxicolesterol. Los resultados se muestran en la Figura 3.16.

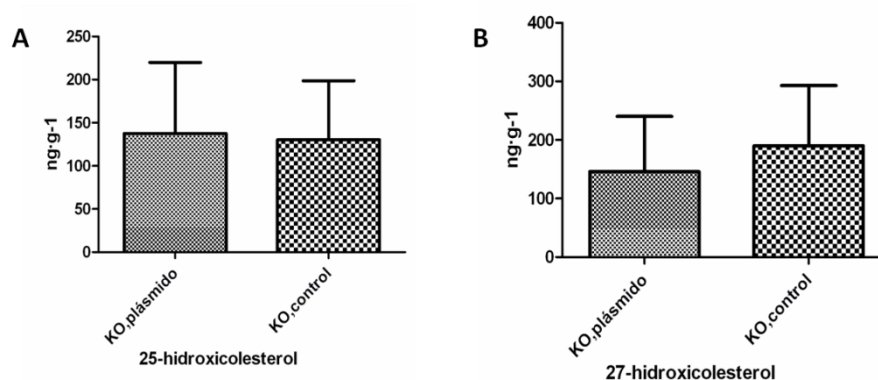


Figura 3.16. Concentración de hidroxiesteroles en hígado en situación de ayuno. En la gráfica se muestran ratas KO y ratas KO cuando se les ha inyectado un plásmido. A) 25-hidroxicolesterol libre en hígado, B) 27-hidroxicolesterol libre en hígado

Solamente las muestras 382 y 383 que correspondían a animales a los que se les había inyectado el plásmido, dieron resultados satisfactorios. En estos dos casos, los niveles de 25-hidroxicolesterol descendían hasta alcanzar valores de animales *WT*, es decir, sanos y para los que podría pensarse que la inyección del plásmido tiene los efectos terapéuticos esperados para estos animales. Los demás animales no resultaron ser buenos expresadores del plásmido y por eso presentaron valores iguales a los de las ratas enfermas o *KO*. En el caso del 27-hidroxicolesterol, tampoco se observaron diferencias entre *KO* y *WT*. Las pruebas de significación así lo mostraron también ($p=0,40>0,05$). En estos animales, el 25-hidroxicolesterol se confirmaría como sustrato preferido de la enzima codificada por el gen *Cyp7b1*. En la Figura 3.16 se puede ver que no hay diferencias significativas entre las ratas *WT* y las que se les inyectó el plásmido. Por otro lado las ratas *KO* presentaron niveles parecidos a *WT* y ratas con plásmido.

- *Hidroxiesteroles totales*

En este caso, el cálculo de la concentración total de ambos hidroxiesteroles no mostró cambios respecto a las conclusiones obtenidas para las formas libres. El test estadístico no dio diferencias significativas entre las ratas control y las ratas con plásmido para ninguno de los dos analitos: 25-hidroxicolesterol ($p=0,70>0,05$) y para 27-hidroxicolesterol ($p=0,13>0,05$). Los resultados se muestran en la Tabla 3.13

Tabla 3.13. Concentraciones de hidroxiesteroles totales en condición de ayuno en ratas plásmido

PLÁSMIDO		CONCENTRACIÓN TOTAL	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·g ⁻¹)	27-OH (ng·g ⁻¹)
373	KO,control	163	119
374	KO,control	194	52
375	KO,control	151	35
385	KO,control	33	45
386	KO,control	143	70
387	KO,control	24	40
382	KO,plásmido	34	41
383	KO,plásmido	58	39
388	KO,plásmido	157	206
392	KO,plásmido	184	70
393	KO,plásmido	190	135
397	KO,plásmido	148	61
$\mu \pm \sigma$ control		118 \pm 71	60 \pm 31
$\mu \pm \sigma$ plásmido		128 \pm 66	92 \pm 68
KO,control/KO,plásmido		~1(0,92)	~1(0,65)

Una representación de los resultados obtenidos con la prueba Mann-Whitney se muestra en la Figura 3.17.

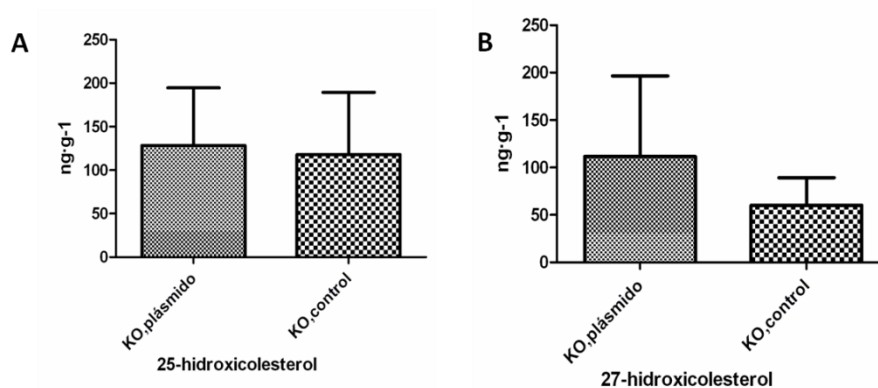


Figura 3.17. Concentración de hidroxiesteroles en hígado en situación de ayuno. En la gráfica se muestran ratas KO y ratas KO cuando se les ha inyectado un plásmido. A) 25-hidroxicolesterol total en hígado B) 27-hidroxicolesterol total en hígado

- *Esterificación*

Se comprobó que solamente el 10% del 25-hidroxicolesterol está esterificado en estos animales. Este resultado estaba en concordancia con lo obtenido en el apartado anterior para este compuesto en condiciones de ayuno largo, para ratas *KO*. Para 27-hidroxicolesterol no se observó tan apenas porcentaje esterificado. La cantidad libre de 27-hidroxicolesterol resultó ser similar a la total para estas condiciones. Este hecho sugiere de nuevo, que el plásmido no estaría funcionando para la mayoría de los casos. Una representación puede verse en la Figura 3.18.

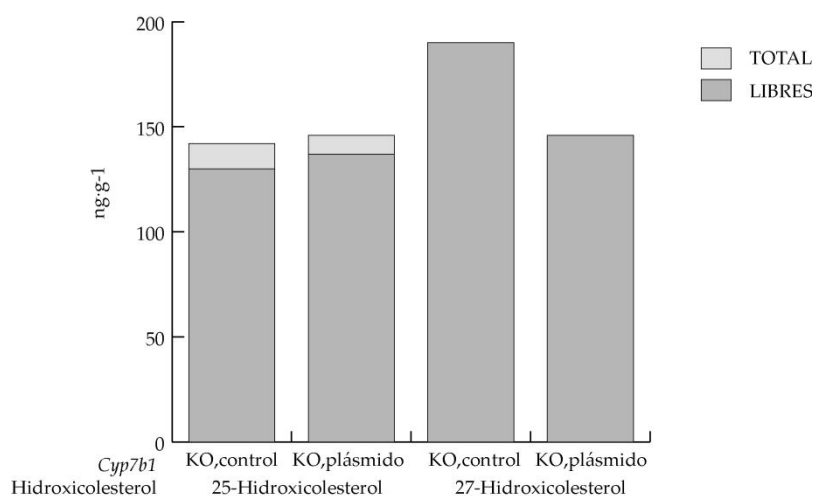


Figura 3.18. Distribución de los hidroxiesteroles libres y esterificados de ratas *KO* control y ratas *KO* con plásmido en el tejido hepático en condiciones de ayuno largo

5-CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas durante el trabajo desarrollado en este capítulo se resumen a continuación:

- I. Es mejor llevar a cabo el homogeneizado de la muestra triturando el tejido en una mezcla de disolventes que tenga en cuenta el contenido de agua del tejido, que añadir un agente secante y disgregante al principio y extraer después.
- II. Con este método se ha conseguido saber que el 25-hidroxicolesterol es el principal marcador de la mutación del gen *Cyp7b1*, ya que este compuesto tiende a acumularse más que el 27-hidroxicolesterol, tanto en situación de ayuno como en postprandial.
- III. Se ha sabido que el plásmido que se introdujo en los animales *KO* no ha dado resultados satisfactorios, salvo en dos casos aislados.
- IV. Se ha podido comprobar que realizar análisis en situación postprandial resulta más complicado que en situación de ayuno largo, ya que se observa una movilización de los sustratos que se traduce en una mayor complejidad para interpretar los resultados.

CAPÍTULO 4: DETERMINACIÓN DE HIDROXIESTEROLES EN PLASMA DE RATA Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES HEPÁTICOS.

1-INTRODUCCIÓN

El hígado es el centro metabólico del organismo de cualquier ser vivo ya que regula los niveles de distintos metabolitos para asegurar el adecuado suministro de los mismos al cerebro, al músculo y a otros órganos periféricos (Russell y cols.,1992). Por ello, cualquier proceso que se vea alterado en el hígado, se refleja en el funcionamiento de otros órganos.

El medio habitual de transporte de metabolitos desde los órganos productores hasta los órganos donde son requeridos es el plasma sanguíneo.

Debido a esto, una forma de obtener información sobre lo que está pasando en el hígado es a través de la presencia o ausencia de determinados compuestos en el plasma. Este es el motivo por el que se planteó la posibilidad de realizar el análisis del plasma de las ratas objeto de estudio.

El metabolismo de los hidroxiesteroles mediado por el gen *Cyp7b1* tiene lugar fundamentalmente en el hígado y en menor medida en el tejido vascular y en las células inmunológicas (Honda y cols.,2004; Stiles y cols.,2009). Como se ha comentado, la forma principal de transporte de los hidroxiesteroles en el plasma es a través de las lipoproteínas y en forma esterificada con ácidos grasos (Dzeletovic y cols.,1995; Honda y cols.,2004). Es importante destacar que no todos los hidroxiesteroles circulantes son endógenos. También pueden provenir de la dieta y de la oxidación no enzimática del colesterol, proceso que tiene lugar de forma natural en el organismo (Brown y cols.,1999). Este hecho, puede complicar la tarea de conocer el origen del metabolito e impedir establecer una buena conclusión entre el metabolismo hepático y los niveles plasmáticos de compuesto.

En el plasma nos encontramos con otros analitos de la familia del colesterol como son sus precursores (lanosterol y desmosterol) que también informan de la homeostasis del colesterol en el organismo y pueden ayudar a comprender mejor las consecuencias metabólicas del mal funcionamiento del gen *Cyp7b1* (Miettinen y cols.,2003; Miettinen y cols.,2011).

A través del estudio de las condiciones de ayuno libre y postprandial se pretende determinar los efectos de la alimentación en estos animales ya que se

ha demostrado una correlación positiva entre la absorción de colesterol y los niveles de fitoesteroides circulantes (Miettinen y cols.,1990; Thompson,2004).

Por otro lado, trabajar con plasma hace más sencillo el proceso de obtención de muestra. La extracción del plasma requiere exclusivamente una punción y sin embargo una biopsia hepática es mucho más complicada y pone en riesgo la vida del animal. Evitar este riesgo es muy interesante en el caso los animales *KO*, ya que son modelos patológicos difíciles de generar y mantener.

Otra ventaja es facilitar el tratamiento de muestra, ya que se eliminaría la etapa de homogeneizado con ultraturrax y se comenzaría directamente con una extracción líquido-líquido. Al eliminar una etapa crítica del proceso se consigue una reducción del tiempo, material y pérdidas de analito. También aumentaría así el número de muestras que se pueden procesar cada día.

2-OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo es adaptar el método utilizado en el capítulo 3 a muestras de plasma.

Una vez realizado, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las concentraciones libres y totales 25 y 27-hidroxicoolesterol.
- Realizar estudios estadísticos de correlación con los niveles de hidroxiesteroides obtenidos en el capítulo 3 para determinar si la alteración de los niveles de hidroxiesteroides en plasma, refleja la misma variación en la concentración hepática cuando falla el gen *Cyp7b1*.
- Determinar los niveles de precursores de colesterol y fitoesteroides en plasma, para tener una visión más completa de cómo afecta la disrupción del gen *Cyp7b1* al metabolismo del colesterol.

3-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1-MATERIALES Y REACTIVOS

Los estándares utilizados fueron 25-hidroxicolesterol: (pureza 99%, número CAS: 2140-46-7), 27-hidroxicolesterol (99%, 20380-11-1), y 25-hidroxicolesterol-26,26,26,27,27,27 (d6) (estándar interno, 99%,88247-69-2). Todos fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EEUU), desmosterol (85%, 303-04-2), lanosterol (97%, 79-63-0); campesterol (65%, 474-62-4), estigmasterol (95%, 83-48-7), sitosterol (95%, 83-46-5), y colesterol 26,26,26,27,27,27-(d6) (estándar interno 2, 97%, 60816-17-3) colesteril estearato (96%,35602-69-8), hidróxido de potasio (85%,1310-58-3), BHT (99%,128-37-0) adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los disolventes utilizados fueron metanol (calidad analítica para LCMS, 67-56-1), etanol (calidad analítica HPLC, 67-63-0), cloroformo (calidad analítica para HPLC, 67-66-3) y hexano (96%; 110-54-3). Los disolventes provienen de Sharlab (Barcelona, España). El agua se suministraba por un equipo Milli-Q Plus 186 de Millipore (Billerica, MS, EEUU).

Todas las disoluciones necesarias, tanto para la optimización como para la cuantificación, se prepararon a partir de disoluciones patrón aproximadamente de $1000\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ conteniendo los compuestos en metanol, excepto colesteril estearato que se preparó en hexano. Las disoluciones siempre se conservaron a -20°C .

Los cartuchos de extracción en fase sólida utilizados fueron MFE®-PAK Amino (500mg/3mL) proporcionados por Análisis Vínicos (Tomelloso, CR España). La extracción se llevó a cabo utilizando un equipo extractor de veinte muestras y aplicando vacío mediante una bomba.

3.2-INSTRUMENTOS

Se utilizó una balanza analítica GR-202-EC A&D Instruments LTD (Tokio, Japón); un Agitador Rotacional (Barcelona, España); una centrífuga Selecta Centromix (Salamanca, España); una Microfuge® 18 Centrifuge, Beckman Coulter™ (Brea, CA, USA), un Manifold de Waters (Milford, MA; EEUU); un Vórtex Velp Scientifica Instruments 50-60 Hz (Usmate, MB; Italia); y un baño de Ultrasonidos Branson 3510 MTH (Fredericksburg, Virginia, USA). Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de ultra-alta resolución ACQUITY UPLC™ H-Class acoplado a TQD espectrómetro de masas triple cuadrupolo ambos de Waters (Milford, MA, EE.UU).

3.3- MUESTRAS

Las muestras de plasma utilizadas se extrajeron de ratas macho WT y KO para *Cyp7b1*, mediante punción intracardiaca. Tras la extracción de la sangre, se añade EDTA 0,5M al 0,5% disuelto en PBS. Las muestras se refrigeran en hielo picado y se centrifugan durante 5 minutos a 3500rpm, separando el plasma y ultracongelando la muestra en nitrógeno líquido, para ser almacenadas a -80°C hasta el momento de su procesado. Los estudios

postprandiales se realizaron para ambos tipos de animales *KO* y *WT*, tras la ingesta de 5mL de aceite de oliva virgen extra (Aceites Toledo, España) y se sacrificaron 8 horas después de la alimentación.

3.4-TRATAMIENTO DE MUESTRA

3.4.1-Hidroxiesteroides libres

Se partió de 100 μ L de plasma de rata, a los que se le añaden 0,75mL (0,93g) de una mezcla cloroformo/metanol (2:1,v/v) que contenía 4,5 μ L de una disolución de estándar interno a 9,5 μ g \cdot g⁻¹ y 6,5 μ L de una disolución de BHT de 1150 μ g \cdot g⁻¹, ambas en metanol. A continuación, se añadieron 0,25mL (0,35g) de cloroformo y se homogeneizó bien con un vórtex. Se repitió este último proceso con 0,25mL (0,25g) de agua Milli-Q. Todo ello, se llevó a un agitador rotacional y allí se mantuvo durante 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 9000rpm durante 10 minutos. Tras la separación de las fases, se recuperó la fase inferior orgánica con una pipeta Pasteur de vidrio. Se repitió una segunda vez la extracción, homogeneización y centrifugación, y se llevó a sequedad bajo corriente de N₂ en un baño térmico a 40°C. Seguidamente, se añade 1mL hexano y se introdujo en un baño de ultrasonidos a T^a ambiente durante 5 minutos. Tras esto se procedió al proceso de extracción en fase sólida.

3.4.2-Hidroxiesteroides, precursores y fitoesteroides totales: hidrólisis alcalina

Si queremos determinar la concentración total de hidroxiesteroides, precursores y fitoesteroides en plasma, a la mezcla extractante se le añaden también 8µL de estándar interno 2 a 9,5µg·g⁻¹. El protocolo anterior cambia tras realizar la extracción. A partir de este punto se añaden los siguientes pasos: Una vez obtenida la fase inferior, mayoritariamente cloroformo, se añadieron 2mL de una solución recién preparada de hidróxido de potasio 0,9M etanol/agua Milli-Q (9:1, v/v). Tras esto y un pulso de vórtex, se dejó 1 hora y 30 minutos a 37 °C. Tras la reacción, se deja enfriar a T^a ambiente y se añade 1mL de cloruro de sodio saturado (1g de cloruro de sodio en 3mL agua Milli-Q) y se da nuevamente un pulso de vórtex. Seguidamente, se añadieron 2mL de cloroformo y se centrifugó 5 minutos a 3000rpm. Tras la separación de las fases, se recogió la fase inferior y se trasvasó a un tubo de vidrio limpio. Se procede a reextraer con 1,5mL cloroformo y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 3000rpm. Este segundo extracto se añadió al primero y se llevó a sequedad bajo corriente de N₂ a 40°C. Seguidamente, se añadió 1mL de hexano y se introdujo en un baño de ultrasonidos a T^a ambiente durante 5 minutos. Tras esto se procedió al proceso de extracción en fase sólida.

3.5-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Se procedió de la misma forma explicada en el capítulo 3. Un resumen del procedimiento se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Protocolo de SPE para aislamiento de hidroxicolesteroles

Acondicionamiento	2 mL metanol
Equilibrado	5 mL hexano
Carga	1 mL extracto en hexano
Lavado	1 mL hexano
Recuperación	4 mL cloroformo/metanol (23:1, v/v).

Los 4mL recuperados se llevaron a sequedad utilizando una corriente de N₂ a 40°C. Finalmente, se redisolvió en 0,12g de metanol/agua Milli-Q (9:1,v/v) y se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. De este modo, la muestra quedaba lista para su análisis cromatográfico.

3.6-ANÁLISIS POR LC/MS

En esta ocasión, la fuente de iones trabajó en modo ESCI® que combina *ESI* y la *APCI* dentro de la misma fuente de iones, lo que permite utilizar ambos tipos de ionización en un mismo análisis.

El gradiente, las condiciones de detección aplicadas y los valores de m/z y voltaje de cono para cada compuesto se adjuntan en la Tabla 4.2. Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el programa MassLynx v.4.1 de Waters (Milford, MA, EE.UU).

Tabla 4.2. Condiciones para la cuantificación de los analitos estudiados en plasma

Columna	UPLC™ BEH C18 100 mm x 2,1 mm x 1,7 μm				
Temperatura de la columna	40 °C				
Temperatura de la muestra	10 °C				
Volumen de inyección	20 μL				
Fase móvil	Disolvente A	Metanol con ácido fórmico 0,1% (v/v)			
	Disolvente B	Agua Milli-Q con ácido fórmico 0,1% (v/v)			
	Caudal	0,300 mL/min			
Gradiente	Tiempo (min)	Disolvente A (% v/v)			
	0,00	70			
	2,00	70			
	2,10	85			
	4,00	85			
	14,00	100			
	19,00	100			
	19,10	70			
	22,00	70			
Interfase	ESI-APCI (ESCI)				
Modo de detección	SIR				
Ionización	positivo				
Voltaje del capilar	3,00 kV				
Voltaje de corona	10 μA				
Temperatura de desolvatación	450 °C				
Caudal de gas de desolvatación	600 L/h				
Caudal de gas de cono	40 L/h				
Temperatura fuente	120 °C				
Compuesto	Peso molecular	m/z	Mecanismo	Modo	Voltaje cono (V)
25-hidroxicolesterol	402,6	367,3	[M+H-2H2O] ⁺	ESI+	35
27-hidroxicolesterol	402,6	385,3	[M+H-H2O] ⁺	ESI+	35
25d6-hidroxicolesterol	408,6	373,3	[M+H-2H2O] ⁺	ESI+	30
Desmosterol	384,6	367,5	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	30
Lanosterol	426,4	409,5	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	30
Estigmasterol	412,7	395,5	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	30
Campesterol	400,6	383,5	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	25
Sitosterol	414,7	397,6	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	30
Colesterol-d6	392,6	375,5	[M+H-H2O] ⁺	APCI+	30

3.7-PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO

3.7.1-Curva de calibrado y rango lineal

Se prepararon disoluciones con concentraciones en el intervalo desde $20\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ hasta $2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para hidroxiesteroles y precursores de colesterol y de $20\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ hasta $15\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para fitoesteroles en metanol/agua Milli-Q (9:1,v/v) a partir de las disoluciones patrón de $1000\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. A cada punto de la recta se le añadieron $150\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estándar interno y $500\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estándar interno 2 ambos en metanol. Las disoluciones preparadas se inyectaron de forma aleatoria por triplicado. El rango lineal se determinó con seis puntos de calibración, cada uno por triplicado.

3.7.2-Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir del ruido observado en las líneas base de los cromatogramas correspondientes, como tres y diez veces la desviación estándar del blanco, respectivamente.

3.7.3-Precisión: Repetibilidad y precisión intermedia

La repetibilidad de ambos procedimientos se obtuvo a partir de un pool de plasma KO preparado para 6 muestras ($n=6$) ejecutando el método el mismo día, tal como se explica en el apartado 3.4. La precisión intermedia se determinó realizando los procedimientos descritos en este mismo apartado durante tres días ($n=3$).

3.7.4-Recuperación y selectividad

- *Las muestras A*

En este caso, se utilizó una disolución de $100\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en el caso de hidroxiesteroles y precursores y de $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en el caso de los fitoesteroles en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v).

- *Las muestras B*

Se prepararon con pool de plasma KO para tres muestras ($n=3$), en total $300\mu\text{L}$. Posteriormente, se llevaron a cabo los protocolos descritos en el apartado 3.4. Al final del mismo se dopó con $100\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de una disolución de hidroxiesteroles y precursores en metanol/agua Milli-Q (9:1,v/v) y con $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de una disolución de fitoesteroles también en metanol/agua Milli-Q (9:1,v/v).

- *Las muestras C*

Al final del proceso descrito en el apartado 3.4 se dopó con $100\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de una disolución de hidroxiesteroles y precursores y $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de fitoesteroles. Se realizó con pool de $300\mu\text{L}$ de plasma KO para tres muestras ($n=3$).

- *Las muestras D*

Se prepararon tal como se describió en el apartado 3.4 con pool de plasma KO para tres muestras ($n=3$). Las ecuaciones que se utilizaron para el

cálculo de la recuperación y selectividad son las mismas que las descritas en el capítulo 2 (2-4).

3.7.5-Exactitud

Se realizó con muestras dopadas, muestras sin dopar y muestras sin matriz. Se prepararon tres muestras tipo A, tres muestras tipo C y tres muestras tipo D del mismo modo que el explicado en el apartado anterior. La ecuación que se utilizó la misma ecuación que en el capítulo 2.

3.8-ANÁLISIS DE MUESTRAS

Se determinó la concentración de compuestos libres y totales. En condiciones de ayuno largo se estudiaron cinco ratas WT y cinco ratas KO. En el caso de las ratas plásmido se estudiaron seis ratas KO que se utilizaron como control y seis ratas KO con plásmido. Para el estudio de condiciones postprandiales se utilizaron seis animales WT y diez animales KO. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados finales se expresaron como medias \pm desviación estándar de grupo. Las pruebas de significancia se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney estableciendo $p \leq 0,05$. Las correlaciones entre variables se buscaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Para ambas pruebas se utilizó el programa GraphPad.

4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 -ANÁLISIS POR LC/MS: SONDA ESCI

Como en este caso, además de los hidroxiesteros, también se querían determinar los precursores de colesterol y los fitoesteros, inicialmente se pensó en el modo *ESI+* para detectar a todas las familias de compuestos pero se observó que los precursores de colesterol y los fitoesteros, se ionizaban mejor en modo *APCI+*. Las señales obtenidas en modo *APCI+* superaban en más de un orden de magnitud a las obtenidas con *ESI+* y sin embargo, ocurría lo contrario para los hidroxiesteros. A pesar de todo, se pensó en la posibilidad de trabajar solamente en modo *ESI+* para todos los compuestos porque precursores y fitoesteros están a mayores niveles de concentración que los hidroxiesteros en muestras biológicas. Pero tratándose de muestras de plasma y no de tejido, en las que el nivel de concentración de estos analitos es algo mayor, se decidió explorar otras alternativas y tratar de mejorar este problema en la detección.

Se pensó en utilizar la sonda en modo *ESCI*. Cuando se trabaja en este modo la sonda combina los parámetros característicos de la sonda *ESI* (voltaje de capilar) y de la sonda *APCI* (descarga de corona) y la ventaja que presenta es poder aunar ambos modos de detección durante el mismo análisis.

El trabajo de optimización de los parámetros de la sonda para operar en este modo se realizó mediante perfusión de una disolución de $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada analito en metanol.

Los voltajes de capilar, corona y cono óptimos obtenidos para cada compuesto y las condiciones del espectrómetro de masas empleados, se muestran en la Tabla 4.2. Con estos parámetros optimizados, se realizaron diferentes análisis de la misma disolución de todos los analitos a $600\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol/agua Milli-Q (9:1,v/v), en las mismas condiciones instrumentales, y en los tres posibles modos de detección: *ESI+*, *APCI+* y *ESCI+*.

Los resultados se muestran en la Figura 4.1. Se pudo comprobar que el modo *ESCI+* proporcionaba señales muy parecidas que el modo *ESI+* para los hidroxiesteres. Para los precursores desmosterol y lanosterol y para el fitoesterol estigmasterol, la ionización en modo *ESCI+* y *APCI+* resultó equivalente, sin embargo para campesterol y sitosterol la señal en modo *ESCI+* mejoraba la obtenida por *APCI+* con lo que suponía una ventaja. La posibilidad de poder realizar la detección de todos los analitos durante el mismo análisis y con un buen nivel de señal, facilitaba mucho el procesamiento de un gran número de muestras (Gallagher y cols.,2003).

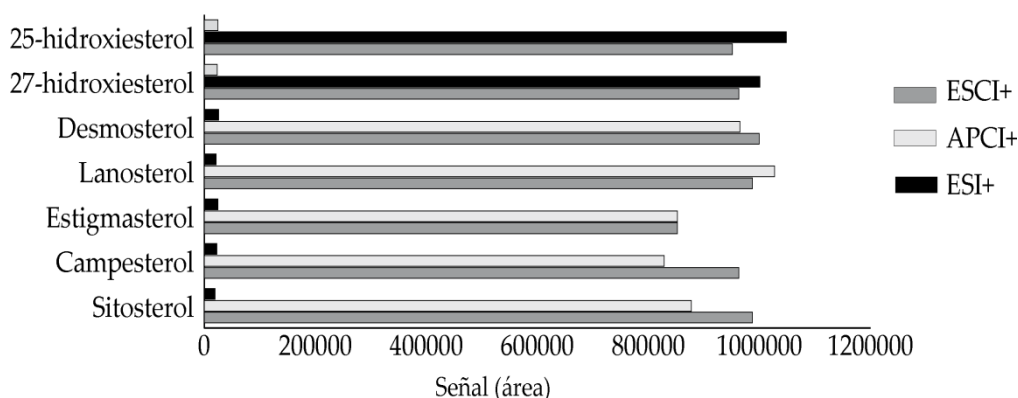


Figura 4.1.Diferencia de señales obtenidas para hidroxiesteres, precursores de colesterol y fitoesteres con la sonda en modo *ESI*, *APCI*, y *ESCI* en positivo

4.2- PARÁMETROS ANALÍTICOS

4.2.1-Hidroxiesteroides, precursores y fitoesteroides libres

Una vez adaptado el método detallado en el capítulo 3 a las muestras de plasma, se calcularon los parámetros analíticos. Se determinó la curva de calibrado y el rango lineal, los límites de detección y cuantificación, la repetibilidad, la precisión intermedia, la eficacia global del proceso y la exactitud. Los resultados se resumen en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Parámetros analíticos del método para determinar la concentración libre de hidroxiesteroides en plasma de rata

MÉTODO LIBRES	25-OH	27-OH
Coefficiente de correlación (r^2)	0,994	0,999
Intervalo lineal ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	5-90	20-200
Límite de detección ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0,2	0,3
Límite de cuantificación ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0,5	1
Repetibilidad (% , n=6)	4	7
Precisión intermedia (% , n=3)	16	14
Eficacia del proceso (% , n=3)	98	80
Exactitud (% , n=3)	2	20

Las curvas de calibrado para los hidroxiesteroides resultaron ser lineales en dos órdenes de magnitud con coeficientes de regresión que oscilaron entre 0,994 para 25-hidroxicolesterol y 0,999 para 27-hidroxicolesterol.

Los límites de detección estuvieron en el rango de los $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ siendo 0,2 para 25-hidroxicolesterol y 0,3 para 27-hidroxicolesterol. Los límites de cuantificación oscilaron entre $0,50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 25-hidroxicolesterol y $1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 27-hidroxicolesterol. Los valores de repetibilidad resultaron ser los adecuados para este tipo de muestras biológicas y el nivel de concentración para el caso de los hidroxiesteroides.

La precisión intermedia fue ligeramente mayor que los valores de repetibilidad, pero mejor en comparación con la que se obtuvo para las muestras de hígado. Los valores fueron 16% para 25-hidroxicolesterol y 14% para 27-hidroxicolesterol. Los estudios de la eficacia global del proceso fueron satisfactorios: 98% para 25-hidroxicolesterol y 80% para 27-hidroxicolesterol.

4.2.2-Hidroxiesteroides, precursores y fitoesteroides totales

Se determinaron los mismos parámetros para el método con hidrólisis alcalina. Los resultados se resumen en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Parámetros analíticos del método para determinar la concentración total de analitos en plasma de rata

MÉTODO TOTALES	25-OH	27-OH	DSM	LAN	STG	CMP	STE
Coefficiente de correlación (r^2)	0,995	0,997	0,993	0,995	0,998	0,997	0,997
Intervalo lineal (ng·mL ⁻¹)	10-400	25-600	0,07-1,3*	3-100	0,04-1,2*	5-13*	1-15*
Límite de detección (ng·mL ⁻¹)	0,6	0,8	11	1	0,8	2	0,3
Límite de cuantificación (ng·mL ⁻¹)	1	3	38	3	3	6	1
Repetibilidad (%; n=6)	5	8	7	9	9	7	3
Precisión intermedia (%; n=3)	14	17	15	19	17	10	12
Eficacia del proceso (%; n=3)	110	94	85	82	75	81	90
Exactitud (%; n=3)	-10	6	15	18	25	19	10

*Cantidades expresada en µg·mL⁻¹

Las curvas de calibrado para todos los analitos fueron lineales en dos órdenes de magnitud. En esta ocasión, los coeficientes de regresión oscilaron entre 0,993 para desmosterol y 0,998 para estigmasterol.

Los límites de detección fueron ligeramente superiores a los obtenidos con el método anterior, aunque también estuvieron en el rango de los ng·mL⁻¹, con valores entre 0,3 para sitosterol y 11 para desmosterol. Los límites de cuantificación oscilaron entre 1ng·mL⁻¹ para 25-hidroxicolesterol y sitosterol y

38ng·mL⁻¹ para desmosterol. Los valores de eficacia del proceso y exactitud fueron adecuados para los objetivos del método. Los valores de repetibilidad y precisión intermedia resultaron ser ligeramente superiores en todos los casos para todos los analitos, en comparación con el apartado anterior, pero se observó una mejora, concretamente en el caso de los hidroxiesteros, respecto de estos mismos valores calculados con este mismo método para muestras de hígado. A pesar de que en el plasma nos encontramos a los hidroxiesteros en menor nivel de concentración, casi un orden de magnitud, el trabajo con plasma facilita el procesamiento de la muestra y repercute en una mejor recuperación y precisión, ya que poder realizar la extracción de Folch directamente sobre el plasma evita el proceso de ultraturrax y posterior asilamiento del tejido.

4.3- CUANTIFICACIÓN DE HIDROXIESTEROS

4.3.1-Ayuno largo

- *Hidroxiesteros libres*

La Tabla 4.5 muestra las concentraciones de hidroxiesteros libres en condiciones de ayuno largo, para animales *KO* y *WT*. Puede observarse que en algunos casos no se obtuvo señal instrumental, porque se encontraban en concentraciones inferiores al límite de detección, debido a la baja concentración de estos analitos en el plasma.

Tabla 4.5 Concentraciones de hidroxiesteroles libres en condiciones de ayuno

AYUNO		CONCENTRACIÓN LIBRE	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·mL ⁻¹)	27-OH (ng·mL ⁻¹)
223	KO	4	9
228	KO	<LD	10
229	KO	1	<LD
231	KO	2	10
250	KO	14	176
235	WT	<LD	10
236	WT	<LD	<LD
239	WT	7	<LD
249	WT	3	159
260	WT	4	62
$\mu \pm \sigma$ (KO)		4 \pm 6	51 \pm 83
$\mu \pm \sigma$ (WT)		3 \pm 3	77 \pm 75
KO/WT		1,5	~1

Se realizó un test no paramétrico Mann-Whitney de dos colas. Para 25 y 27-hidroxicolesterol se obtuvieron los siguientes valores de p ($p=0,917>0,05$) y ($p=0,582>0,05$) respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los animales *KO* y *WT*. Seguramente, esta diferencia, respecto a lo obtenido en hígado para esta misma situación, se debe a que se está teniendo en cuenta un menor número de animales en la estadística. Los resultados pueden verse en la Figura 4.2.

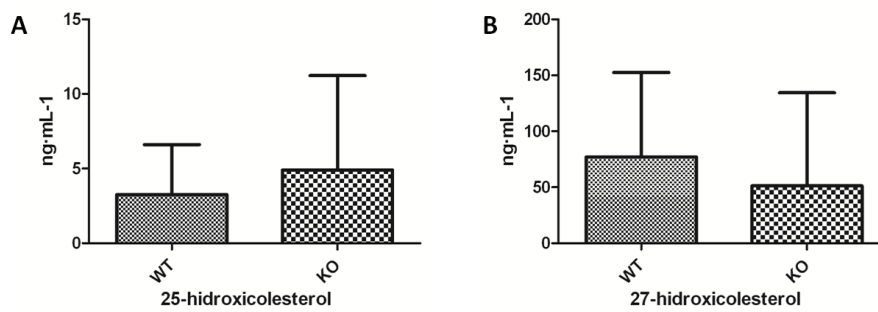


Figura 4.2. Concentración de hidroxiesteroles libres en plasma en situación de ayuno largo.

A) 25-hidroxicolesterol libre en plasma, B) 27-hidroxicolesterol libre en plasma

- *Hidroxiesteroles totales*

En plasma se hace incluso más interesante conocer la concentración total de analitos, debido a que en la mayoría de los casos estos analitos se encuentran esterificados (Burkard y cols.,2004). Como se explicó en la introducción general, a través de la concentración total se puede conocer el porcentaje de esterificación de estos analitos en el organismo, ya que el porcentaje esterificado se calcula conociendo la cantidad libre y la total. Al sustraer la cantidad total de la libre, se sabe la cantidad que hay esterificada (Kuksis,2001). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6 Concentraciones de hidroxiesteroles totales en condiciones de ayuno

AYUNO		CONCENTRACIÓN TOTAL	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·mL ⁻¹)	27-OH (ng·mL ⁻¹)
223	KO	43	66
228	KO	52	73
229	KO	44	71
231	KO	44	75
250	KO	54	91
235	WT	48	62
236	WT	24	46
239	WT	38	81
249	WT	21	71
260	WT	20	120
$\mu \pm \sigma$ (KO)		47 \pm 5	75 \pm 10
$\mu \pm \sigma$ (WT)		30 \pm 12	76 \pm 28
KO/WT		~2(1,6)	~1(0,93)

Se obtuvieron los siguientes valores de p con el test no paramétrico Mann-Whitney de dos colas ($p=0,059>0,05$) y ($p=0,600>0,05$) para 25 y 27-hidroxicolesterol respectivamente. En este caso, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los animales KO y WT para ninguno de los analitos. Los resultados pueden verse en la Figura 4.3.

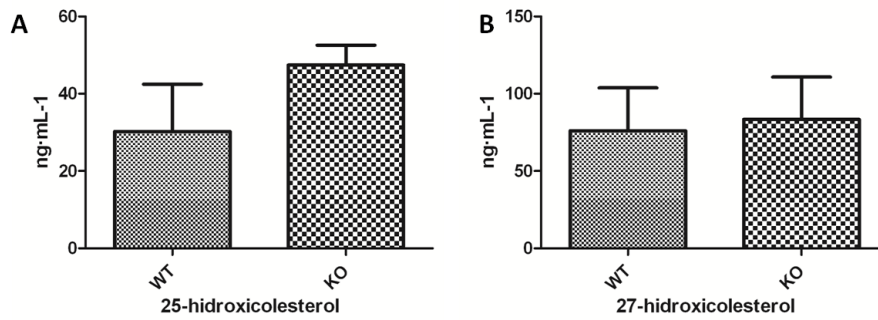


Figura 4.3. Concentración de hidroxisteroles totales en plasma en situación de ayuno largo.
A) 25-hidroxicoolesterol total en plasma, B) 27-hidroxicoolesterol total en plasma

- *Esterificación*

El grado de esterificación calculado para ambos compuestos en situación de ayuno se muestra en la Figura 4.4.

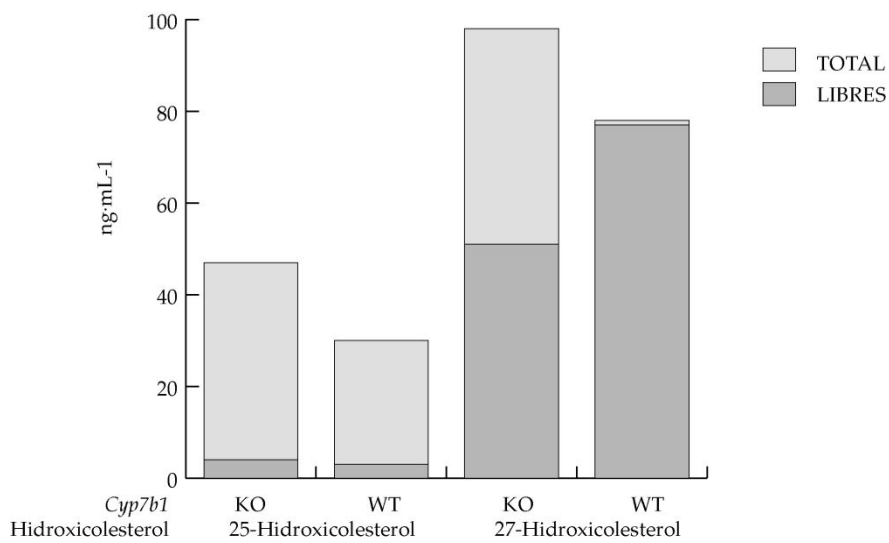


Figura 4.4. Distribución de los hidroxisteroles libres y esterificados en plasma en condiciones de ayuno largo

El grado de esterificación de 25-hidroxicolesterol fue del 90%, tanto para animales *KO* como *WT*. En el caso del 27-hidroxicolesterol esta distribución resultó ser diferente, ya que sólo se observó compuesto esterificado para animales *KO* y a un nivel del 38%. Esta situación se corresponde con lo obtenido en hígado ya que el 27-hidroxicolesterol esterificado era también un 38% para animales *KO*.

4.3.2-Postprandial

- *Hidroxiesteroles libres*

La Tabla 4.7 muestra las concentraciones de hidroxiesteroles libres en plasma en condiciones postprandiales.

Se pudo observar que respecto de las condiciones de ayuno, la concentración de 25-hidroxicolesterol aumenta 4,5 veces en el caso de animales *KO* y al doble en el caso de los animales *WT*. Mientras que la cantidad 27-hidroxicolesterol se mantiene casi sin variación para animales *WT*, pero para animales *KO* aumenta 1,5 veces respecto a los análisis en ayuno.

Para la misma situación en hígado se obtuvieron resultados parecidos. Es interesante ver que el aumento de 25-hidroxicolesterol es más acusado en ambos tipos de animales, confirmándose este analito como un buen marcador de la enfermedad también en plasma.

Tabla 4.7. Concentraciones de hidroxiesteroles libres en condición postprandial

POSTPRANDIAL		CONCENTRACIÓN LIBRE	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·mL ⁻¹)	27-OH (ng·mL ⁻¹)
35	KO	18	89
36	KO	22	133
40	KO	15	51
49	KO	21	57
64	KO	18	44
72	KO	32	143
76	KO	17	98
92	KO	14	36
94	KO	11	50
95	KO	12	70
62	WT	13	94
78	WT	9	52
111	WT	3	65
117	WT	2	64
119	WT	7	46
120	WT	4	99
$\mu \pm \sigma$ (KO)		18 \pm 6	77 \pm 38
$\mu \pm \sigma$ (WT)		6 \pm 4	70 \pm 22
KO/WT		3	~1(1,10)

El test Mann-Whitney dio diferencias significativas entre los animales *KO* y *WT* ($p=0,028<0,05$). Puede verse que la concentración de 25-hidroxicolesterol en ratas *KO* es tres veces superior respecto de las ratas *WT*. El 27-hidroxicolesterol, siguió la misma tendencia que la observada para las pruebas en ayuno. La prueba de significancia no encontró diferencias entre *KO* y *WT* ($p=0,820>0,05$). Se confirma también en plasma la movilización del metabolismo de estos analitos tras la ingestión de alimento. Los resultados se muestran en la Figura 4.5.

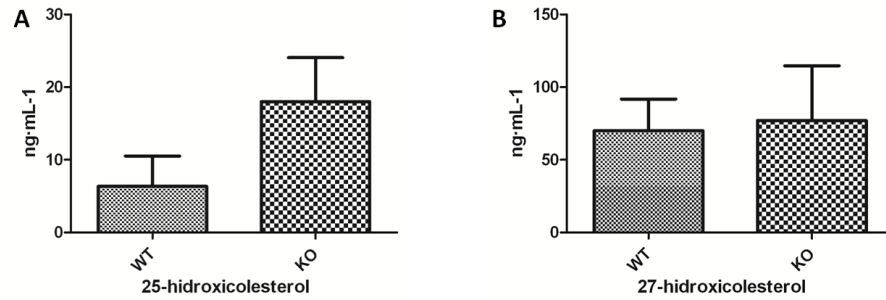


Figura 4.5. Concentración de hidroxiesteros libres en plasma en condición postprandial. A) 25-hidroxicolesterol libre en plasma B) 27-hidroxicolesterol libre en plasma

- *Hidroxiesteros totales*

La Tabla 4.8 muestra las concentraciones de hidroxiesteros totales.

Tabla4.8. Concentración de hidroxiesteros totales en plasma en situación postprandial

POSTPRANDIAL		CONCENTRACIÓN TOTAL	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·mL ⁻¹)	27-OH (ng·mL ⁻¹)
35	KO	105	145
36	KO	92	98
40	KO	69	168
49	KO	71	143
64	KO	69	60
72	KO	25	405
76	KO	34	104
92	KO	75	106
94	KO	63	39
95	KO	81	153
62	WT	48	<LD
78	WT	22	141
111	WT	40	342
117	WT	18	85
119	WT	38	33
120	WT	26	121
$\mu \pm \sigma$ (KO)		68±24	113±43
$\mu \pm \sigma$ (WT)		32±12	132±66
KO/WT		2	1

Puede verse que el valor del animal 72 para 27-hidroxicolesterol es un outlier, la prueba dio como resultado Q de Dixon, $Q=0,64 > 0,568 = Q_{\text{tabla}}$ con un nivel de confianza del 99%. La concentración total de 25-hidroxicolesterol en las ratas *KO* es casi 4 veces superior al libre. Lo mismo ocurre en el caso de los animales *WT* en los que la concentración total del compuesto es 5 veces superior al libre. Para 27-hidroxicolesterol los animales *KO* presentan un contenido total 1,5 veces superior al libre y casi el doble en animales *WT* confirmandose así, un aumento de los analitos en la cantidad total respecto de la libre.

El test Mann-Whitney concluyó con un nivel de confianza del 95% ($p=0,007 < 0,05$) que para 25-hidroxicolesterol hay diferencias significativas entre *KO* y *WT*, como ocurría en hígado. Para 27-hidroxicolesterol no se observaron diferencias significativas entre los animales *KO* y *WT* ($p=0,679 > 0,05$) al igual que sucedía en hígado. Los resultados se muestran en la Figura 4.6.

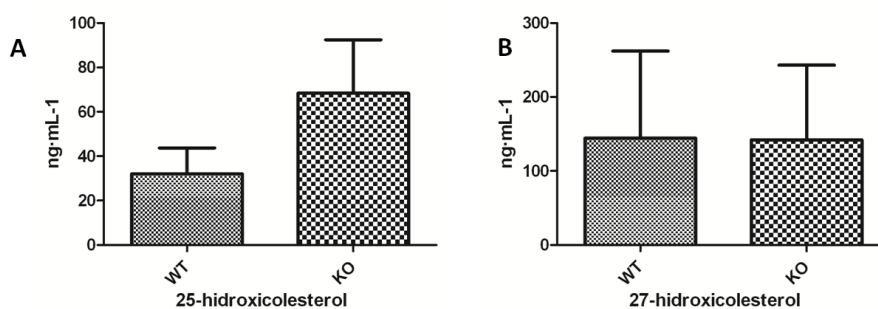


Figura 4.6. Concentración de hidroxiesteros totales s en plasma en condición postprandial.
A) 25-hidroxicolesterol total en plasma B) 27-hidroxicolesterol total en plasma

- *Esterificación*

Para 25-hidroxicolesterol se observó un nivel de esterificación próximo al 80% para ambos tipos de animales *KO* y *WT*. Estos datos de esterificación están de acuerdo con los encontrados en la bibliografía (Li-Hawkins y cols.,2000) y difieren de lo que sucede en hígado, ya que prácticamente, este compuesto no se encuentra esterificado. Para el caso del 27-hidroxicolesterol, se observó un nivel de esterificación del 28% para *KO* y 45% para *WT*. Este hecho contrasta con lo que se observó en hígado, en el que tan apenas estaba esterificado. Podría pensarse entonces que el aporte de 27-hidroxicolesterol esterificado proviene de otro tejido diferente al hígado. También es destacable que aunque las cantidades totales aumenten respecto de las libres, los niveles de esterificación de los analitos se mantienen iguales en condiciones de ayuno y postprandial.

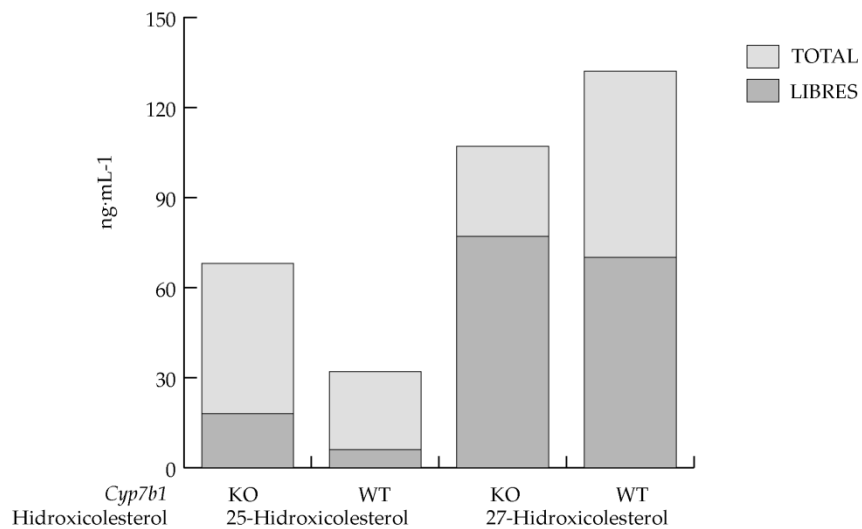


Figura 4.7. Distribución de los hidroxiesteros libres y esterificados en plasma en condiciones postprandiales.

4.3.3-Plásmido

- *Hidroxiesteroles libres*

El estudio se realizó en condiciones de ayuno. Se calculó la concentración de ambos hidroxiesteroles para seis animales KO que sirvieron como control del experimento. La Tabla 4.9 muestra los resultados obtenidos en el experimento para comprobar el funcionamiento del plásmido a través de las cantidades medidas en plasma.

Tabla 4.9. Contenido de hidroxiesteroles libres en plasma en condiciones de ayuno en ratas plásmido

PLÁSMIDO		CONCENTRACIÓN LIBRE	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·mL ⁻¹)	27-OH (ng·mL ⁻¹)
373	KO,control	36	36
374	KO,control	29	23
375	KO,control	64	213
385	KO,control	6	229
386	KO,control	24	24
387	KO,control	7	16
382	KO,plásmido	45	191
383	KO,plásmido	6	30
388	KO,plásmido	14	27
392	KO,plásmido	22	25
393	KO,plásmido	40	42
397	KO,plásmido	33	40
$\mu \pm \sigma$ control		28 \pm 21	92 \pm 100
$\mu \pm \sigma$ plásmido		27 \pm 15	59 \pm 65
KO,control/KO,plásmido		~1	1,8

La prueba Mann-Whitney no encontró diferencias significativas ni para 25-hidroxicoolesterol ($p=0,937>0,05$), ni para 27-hidroxicoolesterol ($p=0,820>0,05$). Los resultados se muestran en la Figura 4.8.

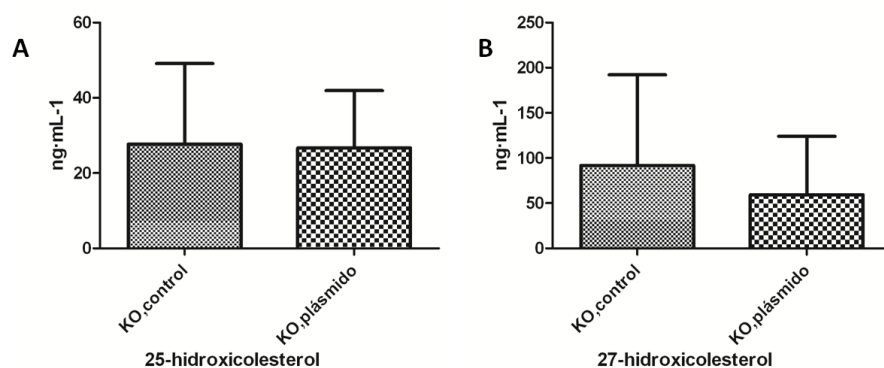


Figura 4.8. Concentración de hidroxiesteroides libres en plasma en ratas plásmido. A) 25-hidroxicolesterol libre en plasma B) 27-hidroxicolesterol libre en plasma

- *Hidroxiesteroides totales*

La Tabla 4.10 muestra las concentraciones obtenidas en este caso

Tabla 4.10. Contenido de hidroxiesteroides totales en plasma en ayuno en ratas plásmido

PLÁSMIDO		CONCENTRACIÓN TOTAL	
NÚMERO	GENOTIPO	25-OH (ng·mL ⁻¹)	27-OH (ng·mL ⁻¹)
373	KO,control	57	175
374	KO,control	64	174
375	KO,control	73	171
385	KO,control	23	171
386	KO,control	49	161
387	KO,control	18	175
382	KO,plásmido	15	89
383	KO,plásmido	19	107
388	KO,plásmido	42	140
392	KO,plásmido	70	99
393	KO,plásmido	66	188
397	KO,plásmido	51	76
$\mu \pm \sigma$ control		48 \pm 22	171 \pm 5
$\mu \pm \sigma$ plásmido		44 \pm 23	44 \pm 23
KO,control/KO,plásmido		~1	1,5

Esta vez, el cálculo de la cantidad total de ambos hidroxiesteroides no mostró cambios respecto a las conclusiones obtenidas para las formas libres.

El test estadístico no dio diferencias significativas entre las ratas control y las ratas con plásmido para ningún analito. Los valores de p fueron ($p=0,818>0,05$) para 25-hidroxicolesterol y para 27-hidroxicolesterol ($p=0,064>0,05$). Los resultados se muestran en la Figura 4.9.

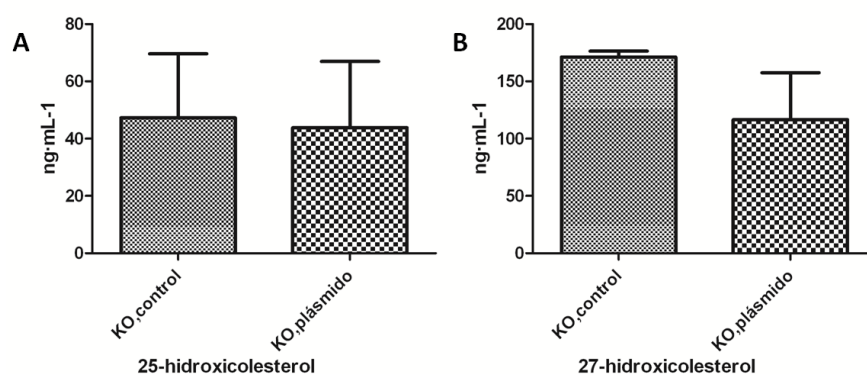


Figura 4.9. Concentración de hidroxiesteros totales en plasma en ratas plásmido. A) 25-hidroxicolesterol total en plasma B) 27-hidroxicolesterol total en plasma

El nivel de esterificación de los analitos se redujo a la mitad en el caso del 25-hidroxicolesterol. Para 27-hidroxicolesterol se mantuvo igual que en condiciones de ayuno. Este resultado se muestra en la Figura 4.10.

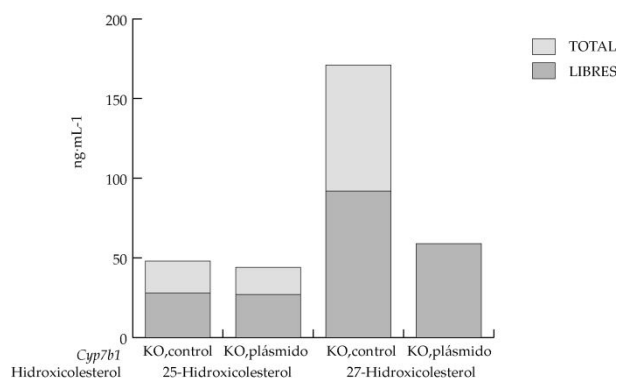


Figura 4.10. Distribución de los hidroxiesteros libres y esterificados en plasma en ratas plásmido.

4.4- CORRELACIÓN HIDROXIESTEROLES EN HÍGADO vs PLASMA

El trabajo llevado a cabo por Hawkins, describe el fenotipo de los ratones que carecen del enzima colesterol 7 α -hidroxilasa codificada por el gen *Cyp7b1*, es decir, que son *KO* para este gen. El estudio confirmó que los niveles de 25 y 27-hidroxicolesterol del tejido hepático estaban alterados, y lo más sorprendente fue ver el mismo aumento en los niveles plasmáticos de estos analitos en estos animales (Li-Hawkins y cols.,2000).

Con este precedente y teniendo en cuenta los resultados de concentración hepática de estos analitos obtenidos en el capítulo 3, se realizó un análisis de correlación de Spearman de dos colas, estableciendo la significación en $p \leq 0,05$. Además, se representarán gráficamente para cada analito, la concentración libre y la concentración total obtenido en plasma en $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente al obtenido en hígado, expresado en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, para ratas *KO* y *WT* en las tres situaciones metabólicas estudiadas: ayuno, postprandial y plásmido.

4.4.1-Ayuno largo

No se observaron correlaciones significativas para 27-hidroxicolesterol en ninguno de los casos (contenido libre y total $r=0,308$ y $r=-0,314$, respectivamente). De esta manera se confirmarían los resultados obtenidos en hígado, en los que no se vio tampoco una separación clara entre individuos enfermos y sanos. Ocurrió lo mismo para el 25-hidroxicolesterol libre, donde el valor de r fue $r=0,662$.

Se observaron correlaciones significativas para la concentración de 25-hidroxicolesterol total, indicando que hay una buena separación entre los individuos enfermos y sanos. Al estar en condiciones de ayuno se podría decir que se reduce al mínimo la posibilidad de que la concentración plasmático de este analito pueda ser debido a lo ingerido en la dieta. Tras este análisis, se puede concluir que al menos para la concentración del 25-hidroxicolesterol en ayuno, queda abierta la posibilidad de poder hacer las determinaciones en plasma sin necesidad de hacer una biopsia hepática. Los resultados se muestran en la Figura 4.11.

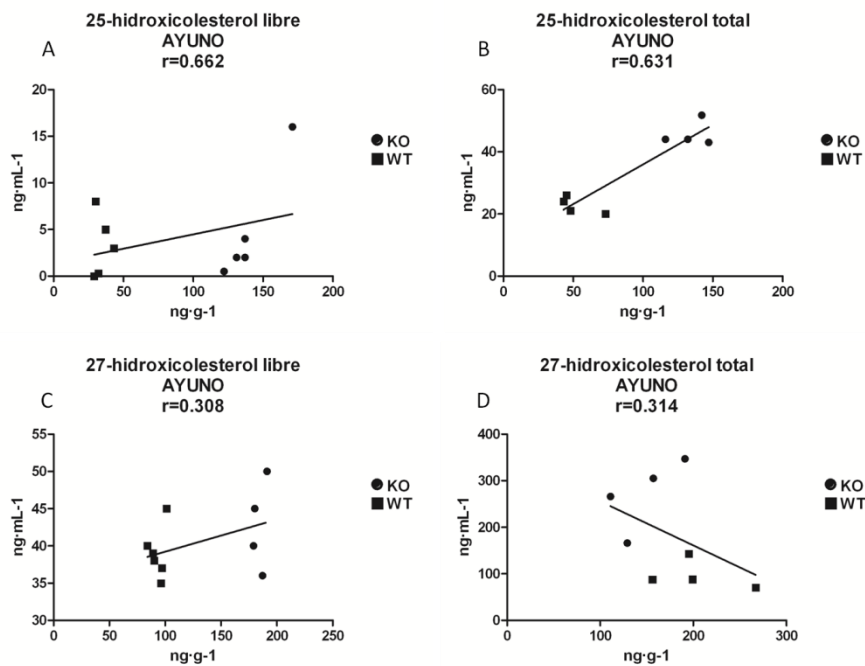


Figura 4.11. Gráficas de correlación hígado-plasma en condición de ayuno largo

4.4.2-Postprandial

Al igual que ocurría en condición de ayuno largo, no se observaron correlaciones significativas para 27-hidroxicolesterol en ninguno de los casos (contenido libre y total $r = 0,140$ y $r = -0,218$, respectivamente). Este hecho podría ser debido a que, tras la ingesta de alimento, el metabolismo se desordena y aun sería más complicado ver alguna diferencia. Al suceder de la misma forma que en ayuno largo, se descarta la alteración de los resultados por posible presencia de productos de oxidación del colesterol ingerido en la dieta.

Para 25-hidroxicolesterol se observaron correlaciones positivas en ambos casos, incluso en el caso de las formas libres, con un valor de $r = 0,767$ y un nivel de significación de $p < 0,01$. En el caso de las formas totales, el valor fue $r = 0,778$, para $p < 0,05$. Al suceder lo mismo que en situación de ayuno, se descarta la influencia de la dieta en estos valores.

Esta correlación positiva no solo daría la posibilidad de realizar análisis en plasma, sino que también el 25-hidroxicolesterol ha resultado ser marcador del gen *Cyp7b1* en condiciones postprandiales. Como se explicó en el capítulo 3, este hecho refleja mejor la realidad del verdadero estado de los animales, ya que la mayoría del tiempo de la vida de los animales transcurre en los periodos postprandiales (Martinez-Beamonte y cols.,2013). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.12.

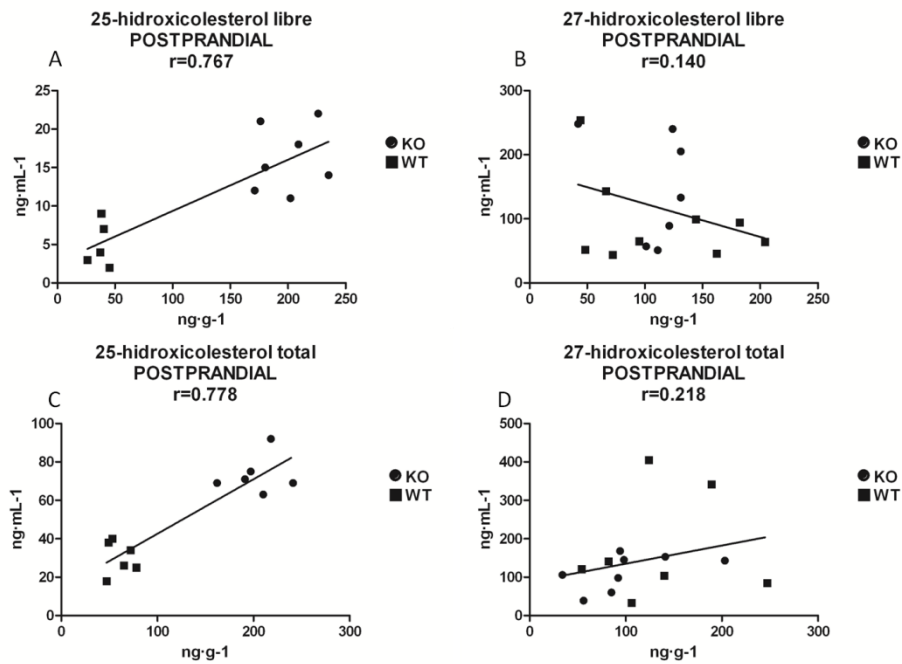


Figura 4.12. Gráficas de correlación hígado-plasma en condición postprandial

4.4.3-Plásmido

En todos los casos el estudio del plásmido, salvo para la cantidad libre de 27-hidroxicolesterol, que no dio buena correlación con $r=-0,400$, para el 27-hidroxicolesterol total y todos los casos de 25-hidroxicolesterol se obtuvieron correlaciones positivas con $r=0,600$; $r=0,643$ y $r=0,797$ respectivamente. En el último caso la correlación fue significativa a nivel $p<0,01$.

A diferencia de lo que ocurría aplicando el test Mann-Whitney por separado a cada grupo de datos en hígado y en plasma. Realizando correlaciones de Spearman entre datos hepáticos y plasmáticos; sí se observan diferencias entre individuos enfermos e individuos en los que el plásmido ha

sido efectivo y se comportan como animales sanos o WT. Además se confirma que con un simple análisis de sangre se puede clasificar a los dos tipos de animales. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.13.

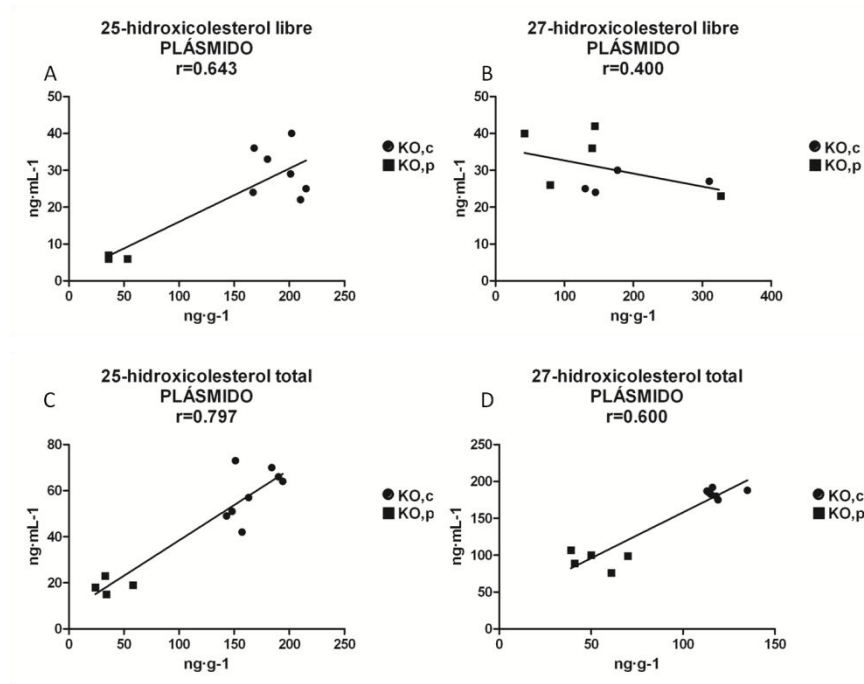


Figura 4.13. Gráficas de correlación hígado-plasma en ratas KO control (KO,c) y ratas plásmido (KO,p) en condición de ayuno.

4.5- ANÁLISIS COMPLEMENTARIO DE PRECURSORES Y FITOESTEROLES

Para completar el estudio se analizaron los niveles totales de precursores y fitoesteroleos de las ratas estudiadas en situación de ayuno y postprandial. Estas determinaciones se realizaron únicamente en plasma.

4.5.1-Precursores

En la Tabla 4.11 se muestran los valores de los precursores de colesterol desmosterol y lanosterol para individuos *KO* y *WT*. El test Mann-Whitney encontró diferencias significativas entre ambas poblaciones *KO* y *WT* ($p=0,032<0,05$) y ($p=0,016<0,05$) respectivamente. Los valores para los animales *WT* coincidieron en ambos casos con los encontrados en bibliografía (Smiljanic y cols.,2013).

Tabla 4.11.Contenido de precursores de colesterol totales en plasma ($\mu\pm\sigma$)

COMPUESTO	AYUNO (ng·mL ⁻¹)			POSTPRANDIAL (ng·mL ⁻¹)		
	KO	WT	p	KO	WT	p
Desmosterol	280±14	537±31	0,032	590±51	460±40	0,589
Lanosterol	23±3	52±1	0,016	48±6	34±8	0,810

Una forma de evitar los efectos tóxicos que provocan en las células el acúmulo de hidroxiesteroleos (lo cual ocurre en individuos *KO*) es tratar de regular los procesos de la síntesis de colesterol. La regulación de estos eventos se hace principalmente por cambios en la transcripción de enzimas reguladoras que responden a estos metabolitos (Norlin y cols.,2004). En este estudio, se concluye que el alto contenido celular de hidroxiesteroleos actúa como inhibidor de los procesos de síntesis de colesterol y ácidos grasos. Este

fenómeno podría explicar el menor contenido de precursores de colesterol encontrados en individuos *KO* y que se muestra en la Tabla 4.11.

En situación postprandial, el test estadístico no encontró diferencias entre ambas poblaciones para ninguno de los precursores. Pero sí se observaron diferencias por el efecto de la alimentación para los individuos *KO*, en los que el nivel de ambos precursores aumentaron al doble, lo que podría indicar una aceleración del metabolismo de la síntesis del colesterol *via* ruta desmosterol (Nes,2011).

4.5.2-Fitoesteroles

En la Tabla 4.12 se muestran los valores de los fitoesteroles obtenidos para los individuos *KO* y *WT*. El test Mann-Whitney no encontró diferencias significativas entre ambas poblaciones *KO* y *WT* ni en condiciones de ayuno ni postprandial, aunque el nivel aumentó en todos los casos, salvo para el campesterol en individuos *KO*, lo cual estaba directamente relacionado con la ingesta de alimento.

Tabla 4.12. Contenido de fitoesteroles totales en plasma ($\mu\pm\sigma$)

COMPUESTO	AYUNO (ng·mL ⁻¹)			POSTPRANDIAL (ng·mL ⁻¹)		
	KO	WT	p	KO	WT	p
Estigmasterol	210±26	230±31	0,321	403±60	354±44	0,310
Campesterol**	10,5±0,6	7,9±0,5	0,905	9,5±0,6	11±1,5	0,812
Sitosterol**	7,2±0,4	7,3±0,5	0,905	11,3±0,8	12,3±0,4	0,114

**Cantidades expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Como se explicó en la introducción, los fitoesteroles disminuyen la absorción de colesterol a nivel intestinal ya que comparten el mismo mecanismo de absorción (Xu y cols.,2008) .

El aumento de la cantidad de los fitoesteroles podría estar relacionado con la menor cantidad de precursores observada en situación postprandial para individuos WT. Esto puede ser porque a la vez que se absorben fitoesteroles también se está adquiriendo colesterol procedente del alimento. En un individuo sano, este hecho, modularía la síntesis de colesterol con el fin de mantener la homeostasis. Este mismo hecho debería ocurrir en animales *KO*, pero en estos animales la descompensación del metabolismo es más acusada y el efecto de la alimentación no es suficiente para llevarlo a los niveles normales.

5-CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas a lo largo de este capítulo se resumen a continuación:

- I. La variación de los niveles de 25-hidroxicolesterol en plasma está relacionada en todos los casos (ayuno, salvo para la concentración libre, plásmido y postprandial) con un mal funcionamiento del gen *Cyp7b1*, que provoca el acumulo del analito en hígado. Sin embargo, los niveles de 27-hidroxicolesterol sólo correlacionaron positivamente en el caso de la inyección de plásmido, donde el cálculo de la cantidad total permitía diferenciar con facilidad los individuos enfermos de los tratados. Confirmada la correlación para 25-hidroxicolesterol, el de tratamiento de muestra se simplifica, ya que se puede prescindir de la biopsia hepática y de la parte de homogeneizado del tejido para determinar a este analito.
- II. El menor contenido de precursores de colesterol encontrados en individuos *KO*, se explica a través del fenómeno de inhibición que el alto contenido celular de hidroxiesteros provoca en los procesos de síntesis de colesterol y ácidos grasos.
- III. Los fitoesteros en situación postprandial mantuvieron la homeostasis del colesterol en individuos *WT* lo que justifica la disminución de la concentración circulante de precursores respecto a la situación de ayuno.

CAPÍTULO 5: HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE HIDROXIESTEROLES ESTERIFICADOS EN PLASMA DE RATA.

1-INTRODUCCIÓN

Como se ha visto en el capítulo anterior, el análisis de la cantidad total de hidroxiesteroles en plasma resulta de interés para tener un conocimiento más amplio sobre el metabolismo de los compuestos relacionados con el metabolismo del colesterol.

En muchas ocasiones resulta inevitable realizar una hidrólisis alcalina a lo largo de un tratamiento de muestra para la determinación de esteroides. Esto es debido a varias razones, una de ellas es que sólo se disponen patrones analíticos para los compuestos libres. Otro motivo es que los ésteres de esteroles

son compuestos muy apolares y su determinación cromatográfica requiere gradientes largos, ya que estos compuestos tienden a quedarse fuertemente retenidos en las fases reversas, muy utilizadas en la determinación de esteroides. Finalmente, la hidrólisis alcalina es una forma de eliminar los lípidos y ácidos grasos de la matriz biológica original para conseguir un extracto más limpio, que facilite los posteriores pasos del tratamiento de muestra (McDonald y cols.,2012).

No hay que olvidar que la hidrólisis alcalina es el paso más controvertido y probablemente el más importante para la generación de artefactos, tanto por la degradación térmica como por el fuerte medio básico que requiere (Park y cols.,1996; Busch y cols.,2009). Es importante destacar la poca especificidad de este tipo de reacciones, ya que no son selectivas para los esteroides, sino que sirven para un amplio rango de analitos (McDonald y cols.,2012).

Tras realizar una revisión bibliográfica, se encontraron métodos analíticos desarrollados para fluidos biológicos, concretamente en orina, para determinar hormonas esteroideas en los que para hidrolizar los conjugados a las formas libres se utilizaba una hidrólisis enzimática. Posteriormente se comparaban los resultados obtenidos con una hidrólisis alcalina convencional. Las conclusiones del trabajo apoyaban la hidrólisis enzimática como la reacción preferida frente a la hidrólisis alcalina. Esto era debido principalmente a la alta afinidad que tiene la enzima por su sustrato, lo que proporcionaba alta especificidad al proceso (Alvarez-Sanchez y cols.,2009).

Al observar la estructura de los hidroxiesteroides de interés y ver que son muy similares al colesterol, se decidió probar a hacer una hidrólisis enzimática con dos enzimas encargadas de hidrolizar el colesterol. Estas enzimas son la colesterol esterasa, obtenida de páncreas de ternera (Pb) y *Pseudomonas* sp (Ps), de origen bacteriano.

Es importante destacar que no están descritos en la bibliografía los lugares de unión de la enzima con los diferentes sustratos, lo que proporcionaría información para predecir nuevos sustratos de la enzima. Tampoco se han encontrado referencias bibliográficas sobre hidrólisis enzimática para la determinación de hidroxiesteroides esterificados en plasma.

2-OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo es desarrollar un método para determinar la concentración total de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en plasma de rata mediante hidrólisis enzimática.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Resolver el problema de deterioro y las pérdidas que sufre la muestra durante el proceso de hidrólisis alcalina.
- Reducir el tiempo de procesado de la muestra respecto a los métodos que utilizan hidrólisis alcalina hasta el momento para la determinación de hidroxiesteros totales.
- Determinar las características analíticas del nuevo método.

3-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1-MATERIALES Y REACTIVOS

Los estándares utilizados fueron 25-hidroxicolesterol: (pureza 99%, número CAS: 2140-46-7), 27-hidroxicolesterol (99%, 20380-11-1), y 25-hidroxicolesterol-26,26,26,27,27,27 (d6) (estándar interno, 99%,88247-69-2). Todos fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids (Alabaster,AL,EEUU). Colesteril estearato (96%,35602-69-8), hidróxido de potasio (85%,1310-58-3), BHT (99%,128-37-0) adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España).

La enzima colesterol esterasa procedente de *Pseudomonas* sp. A12216 y de páncreas bovino A12216 (9026-00-0) se encontraba a una concentración de 200 U/mL en tampon de amplex (0,1 M fosfato potásico (KH_2PO_4), 0,05 M cloruro sódico (NaCl), 5 nM ácido cólico ($\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5$), 0,1% Triton X-100). Estos reactivos fueron adquiridos en Invitrogen (Barcelona, España). El Triton X-100 (99,95%, 9002-93-1), fue adquirido en Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Los disolventes utilizados fueron metanol (calidad analítica para *LC-MS*, 67-56-1), etanol (calidad analítica *HPLC*, 67-63-0), cloroformo (calidad analítica para *HPLC*, 67-66-3), hexano (96%; 110-54-3). Los disolventes provienen de Sharlab (Barcelona, España). El agua se suministraba por un equipo Milli-Q Plus 186 de Millipore (Billerica, MS,EEUU).

Todas las disoluciones necesarias, tanto para la optimización como para la cuantificación, se prepararon a partir de disoluciones patrón de

aproximadamente $1000\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ conteniendo los compuestos en metanol. El colesteril estearato se preparó en hexano. Todas ellas se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los cartuchos de extracción en fase sólida utilizados fueron MFE®-PAK Amino (500mg/3mL) proporcionados por Análisis Vínicos (Tomelloso, CR España). La extracción se llevó a cabo utilizando un equipo extractor de veinte muestras y aplicando vacío mediante una bomba.

3.2-INSTRUMENTOS

Se utilizó una balanza analítica GR-202-EC A&D Instruments LTD (Tokio, Japón); un Agitador Rotacional (Barcelona, España); una Centrífuga Selecta Centromix (Salamanca, España); otra Centrífuga Microfuge® 18 Centrifuge, Beckman Coulter™ (Brea, California, Estados Unidos); un Manifold ,Waters (Milford, MA; EE.UU); un Vórtex Velp Scientifica Instruments 50-60 Hz (Usmate, MB; Italia); un Baño de Ultrasonidos Branson 3510 MTH (Fredericksburg, Virginia, USA); y un Termociclador de Biorad T100 Thermal Cycler (Hervules, California, USA). Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de ultra-alta resolución *ACQUITY UPLC™ H-Class* de Waters (Milford, MA, EE.UU) acoplado a *TQD* espectrómetro de masas triple cuadrupolo de Waters (Milford, MA, EE.UU).

3.3-MUESTRAS

Las muestras de plasma utilizadas se extrajeron de ratas macho *WT* y *KO* mediante punción intracardiaca. Tras la extracción de la sangre, se añade *EDTA* 0,5M al 0,5% disuelto en PBS. Las muestras se refrigeraron en hielo picado y se centrifugan durante 5 minutos a 3500rpm. Posteriormente se separa el plasma y las muestras se ultracongelaron en nitrógeno líquido para ser finalmente almacenadas a -80°C hasta el momento de su procesado. En ese momento, las muestras se descongelan en hielo picado y se procesan al descongelarse sin perder la cadena de frío. Hay que destacar en este caso, que para trabajar con enzimas, es más eficaz la muestra de plasma que la de suero, debido al efecto quelante del *EDTA* (Blanc y cols.,2013). Este procesado es fundamental para respetar la integridad de la muestra evitando degradación de compuestos, especialmente de 25-hidroxicolesterol. De esta forma se reduce al mínimo la formación de artefactos .

3.4-TRATAMIENTO DE MUESTRA

3.4.1-Hidroxiesteroles libres

Se partió de 100μL de plasma de rata, a los que se le añaden 0,75mL (0,93g) de una mezcla cloroformo/metanol (2:1,v/v) que contenía 4,5μL de una disolución de estándar interno a 9,5μg·g⁻¹ y 6,5μL de una disolución de BHT de 1150μg·g⁻¹, ambas en metanol. A continuación, se añadieron 0,25mL (0,35g) de cloroformo y se homogeneizó bien con un vórtex. Se repitió este último proceso con 0,25mL (0,25g) de agua Milli-Q. Todo ello, se llevó a un agitador

rotacional y allí se mantuvo durante 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 9000rpm durante 10 minutos. Tras la separación de las fases, se recuperó la fase inferior orgánica con una pipeta Pasteur de vidrio. Se repitió una segunda vez la extracción, homogeneización y centrifugación, y se llevó a sequedad bajo corriente de N₂ en un baño térmico a 40°C. Seguidamente, se añade 1mL hexano y se introdujo en un baño de ultrasonidos a T^a ambiente durante 5 minutos. Tras esto se procedió al proceso de extracción en fase sólida.

3.4.2-Hidroxiesteroles totales: hidrólisis alcalina

Si queremos determinar la concentración total de hidroxiesteroles en plasma, el protocolo anterior cambia tras realizar la extracción. A partir de este punto se añaden los siguientes pasos: Una vez obtenida la fase inferior, mayoritariamente cloroformo, se añadieron 2mL de una solución recién preparada de hidróxido de potasio 0,9M etanol/agua Milli-Q (9:1, v/v). Tras esto y un pulso de vórtex, se dejó 1 hora y 30 minutos a 37 °C. Tras la reacción, se deja enfriar a T^a ambiente y se añade 1mL de cloruro de sodio saturado (1g de cloruro de sodio en 3mL agua Milli-Q) y se da nuevamente un pulso de vórtex. Seguidamente, se añadieron 2mL de cloroformo y se centrifugó 5 minutos a 3000rpm. Tras la separación de las fases, se recogió la fase inferior y se trasvasó a un tubo de vidrio limpio. Se procede a reextraer con 1,5mL cloroformo y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 3000rpm. Este segundo extracto se añadió al primero y se llevó a sequedad bajo corriente de N₂ a 40°C. Seguidamente, se añadió 1mL de hexano y se introdujo en un baño

de ultrasonidos a T^a ambiente durante 5 minutos. Tras esto se procedió al proceso de extracción en fase sólida.

3.4.3-Hidroxiesteres totales: hidrólisis enzimática

Se parte de 100µL de plasma de rata y se añaden 2µL de Triton X-100, tensoactivo para emulsionar las lipoproteínas y facilitar la reacción completa de los ésteres. Posteriormente, se añadieron 4µL de enzima. Esta mezcla se introdujo en un termociclador, previamente calentado a 37°C, y se mantuvo durante 1 hora y 30 minutos. Tras la reacción, el protocolo continúa con la extracción explicada en el apartado 3.4.1.

3.5-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

El protocolo de extracción en fase sólida fue el mismo que el descrito en los capítulos 3 y 4, Tabla 3.2 y 4.1, respectivamente. Los 4mL recuperados se llevaron a sequedad utilizando una corriente de N₂ en un baño térmico a 40°C. Finalmente, se redisolvió en 0,12g de metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v) y se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. De este modo, la muestra quedaba lista para su análisis cromatográfico.

3.6-ANÁLISIS POR LC/MS

Las condiciones instrumentales utilizadas se muestran en las Tabla 5.1

Tabla 5.1. Condiciones experimentales para la cuantificación de hidroxiesteroides en plasma

Columna	UPLC™ BEH C18 100 mm x 2,1 mm x 1,7 μm				
Temperatura de la columna	40°C				
Temperatura de la muestra	10°C				
Volumen de inyección	20μL				
Fase móvil	Disolvente A	Metanol con ácido fórmico 0,1% (v/v)			
	Disolvente B	Agua Milli-Q con ácido fórmico 0,1% (v/v)			
	Caudal	0,300mL/min			
Gradiente	Tiempo (min)	Disolvente A (% v/v)			
	0,00	70			
	2,00	70			
	2,10	85			
	4,00	85			
	14,00	100			
	19,00	100			
	19,10	70			
	22,00	70			
Interfase	Electrospray				
Modo de detección	SIR				
Ionización	positivo				
Voltaje del capilar	3,00kV				
Temperatura de desolvatación	650°C				
Caudal de gas de desolvatación	600L/h				
Caudal de gas de cono	40L/h				
Temperatura fuente	120°C				
Compuesto	Peso molecular	m/z	Mecanismo	Modo	Voltaje cono (V)
25-hidroxicolesterol	402,6	367,3	[M+H-2H2O] ⁺	ESI+	35
27-hidroxicolesterol	402,6	385,3	[M+H-H2O] ⁺	ESI+	35
25d6-hidroxicolesterol	408,6	373,3	[M+H-2H2O] ⁺	ESI+	30
Colesterol	386,7	369,6	[M+H-H2O] ⁺	ESI+	20
Colesteril estearato	653,1	675,3	[M-H+Na] ⁺	ESI+	20

Los datos fueron adquiridos y procesados mediante el programa MassLynx v.4.1 de Waters (Milford, MA, EE.UU).

3.7-PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO

3.7.1-Curva de calibrado y rango lineal

A partir de las disoluciones patrón de $1000\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol, se prepararon disoluciones con concentraciones en el intervalo desde $20\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ hasta $2000\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v). A cada punto de la recta se le añadieron $300\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estándar interno. Las disoluciones preparadas se inyectaron de forma aleatoria por triplicado. El rango lineal se determinó con 6 puntos de calibración, cada uno por triplicado.

3.7.2-Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir del ruido observado en las líneas base de los cromatogramas correspondientes, como tres y diez veces la desviación estándar del blanco, respectivamente.

3.7.3-Precisión: Repetibilidad y precisión intermedia

La repetibilidad del método analítico se obtuvo ejecutando el método el mismo día, partiendo de un pool de plasma *KO* preparado para 6 muestras ($n=6$), tal cómo se explica en el apartado 3.4.3 La precisión intermedia se determinó realizando el procedimiento descrito anteriormente en este mismo durante tres días ($n=3$).

3.7.4-Recuperación y selectividad

El estudio de recuperación y selectividad del método se realizó también utilizando un pool de plasma *KO*.

- *Las muestras A*

En este caso fue una disolución de $100\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v).

- *Las muestras B*

Se realizó con pool de plasma *KO* para tres muestras ($n=3$), en total $300\mu\text{L}$. Posteriormente, se llevó a cabo el protocolo descrito en el apartado 3.4.3. Al final del mismo se dopada una con 10mg de una disolución de $1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v)

- *Las muestras C*

Las muestras se doparon con $100\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v), al final del tratamiento de muestra. Se realizó con pool de plasma *KO* para tres muestras ($n=3$), en total en total $300\mu\text{L}$ y se continuó con el método tal como se describe en el apartado 3.4.3.

- *Las muestras D*

Se preparan tal como se describió en el apartado 3.4.3 con pool de plasma KO para tres muestras (n=3). Las ecuaciones que se utilizaron utilizarán para el cálculo de la recuperación y selectividad son las mismas que las descritas en el capítulo 2 (2-4).

3.7.5-Exactitud

Se realizó con muestras dopadas con $100\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en metanol/agua Milli-Q (9:1, v/v) y muestras sin dopar. Se prepararon tres muestras tipo A, tres muestras tipo C y tres muestras tipo D del mismo modo que el explicado en el apartado anterior. La ecuación que se utilizó fue la misma que en el capítulo 2, (1).

4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos experimentales que se llevaron a cabo durante el desarrollo del método se muestran en la Figura 5.1.

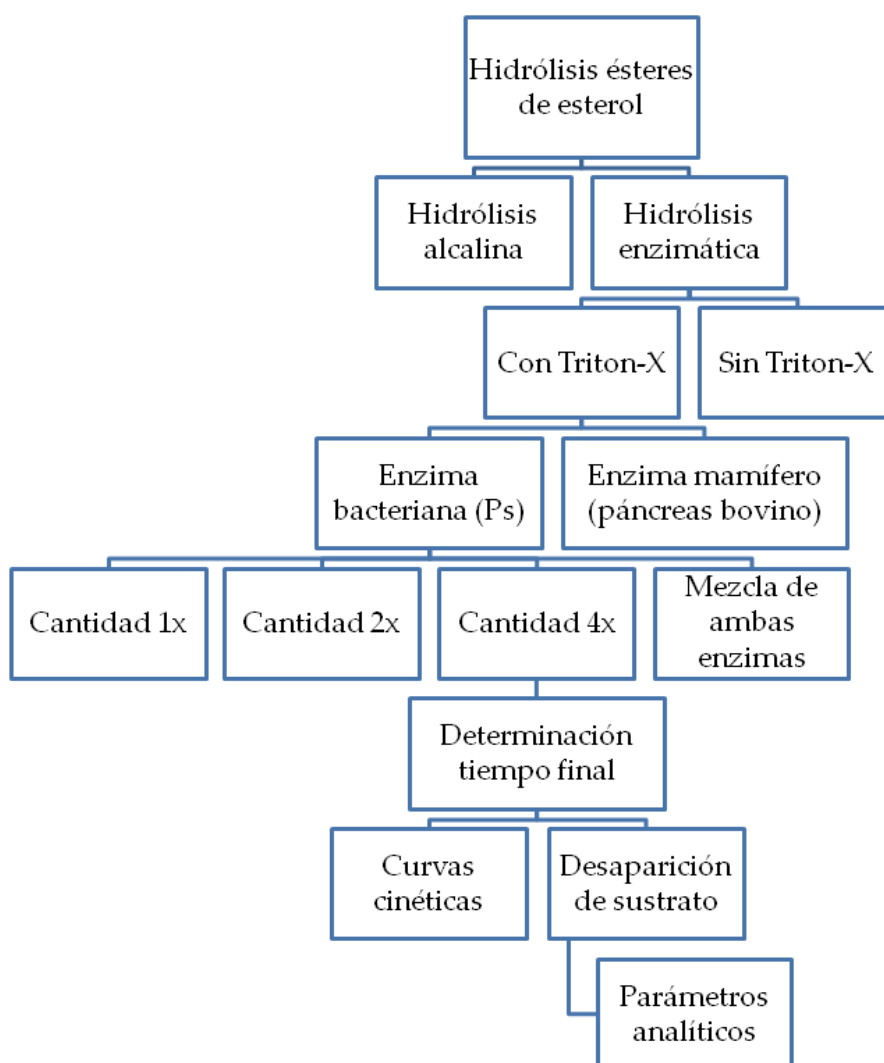


Figura 5.1. Esquema del proceso experimental llevado a cabo para el desarrollo del método

4.1-VERIFICACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El primer paso para el desarrollo del método fue verificar que las enzimas hidrolizan los enlaces de los ésteres de los hidroxiesteroides ya que el sustrato preferido de estas enzimas son los ésteres de colesterol.

Para ello, se llevó a cabo ambos tipos de hidrólisis (alcalina y enzimática), descritas en los apartados 3.4.2 y 3.4.3. Tras el análisis de ambos tipos de muestras, se compararon cualitativamente los cromatogramas obtenidos. La hidrólisis enzimática genera menos artefactos que la hidrólisis alcalina. Los resultados se muestran en la Figura 5.1.

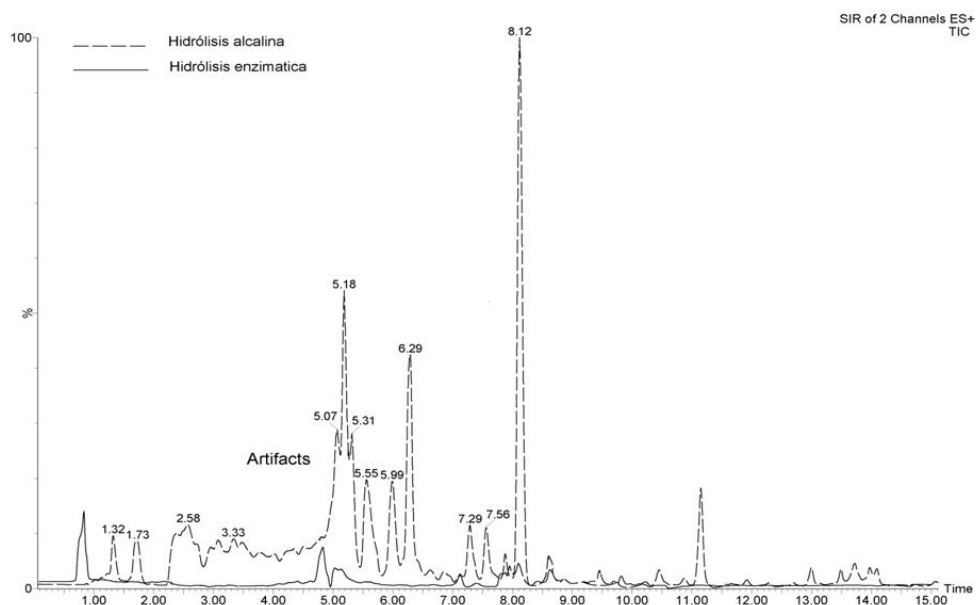


Figura 5.1. Superposición de dos muestras tras la hidrólisis. La línea punteada corresponde a la hidrólisis alcalina y la línea continua corresponde a la hidrólisis enzimática

Esto es debido a que se evitan las condiciones más duras de la hidrólisis alcalina (fuerte medio básico y altas temperaturas) que es lo que provoca la generación de artefactos (Busch y cols.,2009).

Una vez verificada la desaparición de los artefactos de las muestras utilizando la hidrólisis enzimática, se realizó un ensayo de recuperación. Para ello, se compararon cuatro tipos de tratamiento de muestra diferentes: Uno de ellos no pasó por ningún proceso de hidrólisis, realizado como se explicó en el apartado 3.4.1. El segundo comprendía la hidrólisis enzimática, explicada en el apartado 3.4.3. Posteriormente y tras realizar una revisión bibliográfica, se decidió comparar dos tipos de hidrólisis alcalinas, ambas empleadas en la determinación de esteroides. La primera de ellas, propuesta por el autor DeBarber y colaboradores (DeBarber y cols.,2008), correspondía a la descrita en el apartado 3.4.2. La segunda de ellas, fue propuesta por McDonald y colaboradores (McDonald y cols.,2012). Esta hidrólisis alcalina resulta mucho más específica para los esteroides, ya que se proponen mejoras significativas al protocolo convencional como son:

- a) Añadir la base (KOH) muy concentrada (300 μ L, 10N) directamente al extracto de plasma.
- b) Realizar la reacción en atmósfera inerte con N₂;
- c) Utilizar diclorometano en vez de cloroformo en la extracción posterior, ya que se comprobó que el cloroformo era capaz de reaccionar con el KOH del medio provocando la degradación o modificación de los esteroides.

Los experimentos se realizaron partiendo del mismo pool de plasma *KO*, por triplicado. El cálculo de la recuperación se realizó a través del estándar interno deuterado. Se tuvo en cuenta la concentración de partida y la concentración determinada al final del proceso, para cada serie de experimentos. Los resultados se muestran en la Figura 5.2.

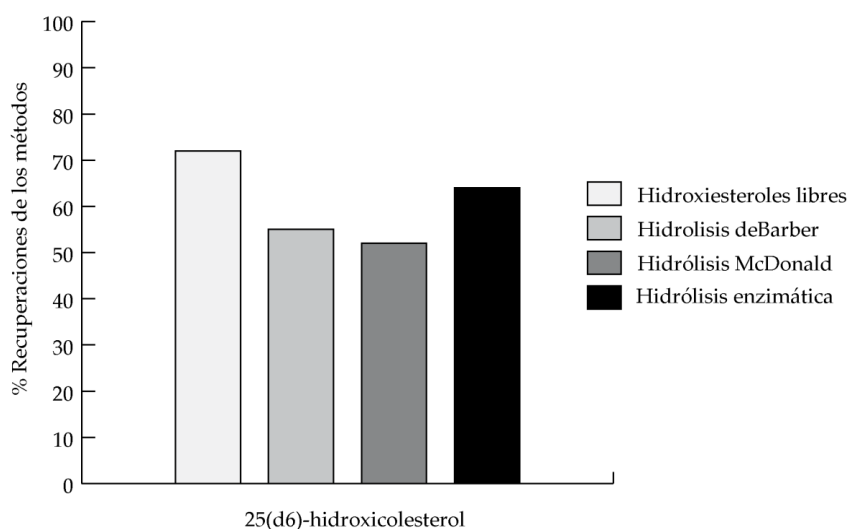


Figura 5.2. Porcentaje de estándar interno deuterado recuperado tras las diferentes hidrólisis realizadas

Se comprobó que la hidrólisis enzimática conseguía recuperaciones mayores que ambas hidrólisis alcalinas y además, eran muy parecidas a las obtenidas con el método que determina hidroxiesterol libre (sin realizar hidrólisis alcalina). Este resultado sugiere que la hidrólisis enzimática no presenta pérdidas significativas de analito a lo largo del tratamiento de muestra y es una de las principales mejoras introducidas esta hidrólisis. Al requerir una menor manipulación de la muestra, mejora la recuperación global del proceso.

4.2-ACCESO DE LA ENZIMA AL SUSTRATO

Es importante recordar que los esteroides se transportan por el plasma gracias a las lipoproteínas. Como se explicó en la introducción general, las lipoproteínas son partículas esféricas que contienen un núcleo compuesto de lípidos apolares (principalmente ésteres de colesterol y triglicéridos) cubiertos de una monocapa de fosfolípidos y unas proteínas llamadas apoproteínas (Hamilton y cols.,1976).

Es muy importante deshacer correctamente esta monocapa de fosfolípidos para poder acceder al interior de la lipoproteína, ya que es allí dónde se encuentra casi la totalidad de los ésteres. Para facilitar este proceso, se pensó en utilizar un tensoactivo que sirviera de emulsionante de esta monocapa, ya que era el método menos perjudicial y más compatible con las condiciones de trabajo de una enzima (Swell y cols.,1955).

Estos experimentos se realizaron utilizando plasmas de rata *KO* y *WT*. En todos los ensayos se partió de 100µL de plasma. Se trabajó con tres tipos de muestras diferentes tanto de plasma *KO* y *WT*.

La primera era solamente plasma, la segunda contenía plasma al que se le añadían 0,2 unidades de enzima que corresponde a 1µL (cantidad fija que resulta de disolver, un preparado comercial a una concentración de 200 U/mL). A la última se le añadió, además de lo anterior, 0,2µL de Triton X-100. Se evitaba así diluir en exceso la muestra y se procuró mezclar bien todos los componentes sin generar burbujas que significarían una degradación de la

enzima. (Brzozowski y cols.,1991). Las muestras se mantuvieron durante 120 minutos en el termociclador a 37°C (temperatura óptima de trabajo de la enzima). Una vez terminada la reacción enzimática, la muestra se procesó como se detalla en el apartado 3.4.1. Estos resultados se muestran en la Figura 5.3.

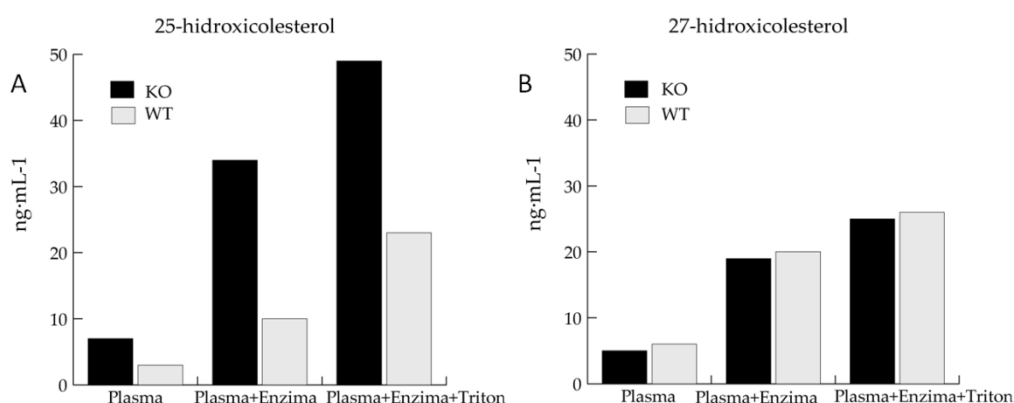


Figura 5.3. Comparación entre varias muestras de plasma en dónde se puede ver que la utilización de Triton X-100 favorece la reacción enzimática para ambos analitos.

Se comprobó que el Triton X-100 mejora el proceso de hidrólisis del enlace éster, tanto en 25-hidroxicolesterol como en 27- hidroxicolesterol en todas las situaciones, tanto en animales KO como en animales WT. El Triton X-100 demostró favorecer la reacción por dos motivos: El primero es que es inocuo para la actividad de la enzima. El segundo es que ayuda a romper la monocapa de las lipoproteínas y emulsiona los sustratos más insolubles en agua. Este último hecho tiene gran importancia, ya que la enzima puede acceder a la mayor cantidad posible de sustrato, situado en el núcleo de la lipoproteína (Taketani y cols.,1981; Anthonsen y cols.,1995; Ruiz y cols.,2001).

Otra conclusión es que mediante este experimento se podría diferenciar si los compuestos se encuentran en la cubierta de las lipoproteínas (muestras tratadas sólo con enzima), o las que se encuentran en el interior de ellas, (muestras tratadas con enzima con Triton X-100), especialmente al encontrarse la mayoría de los compuestos esterificados en el interior de la lipoproteína.

4.3-SELECCIÓN DE LA MEJOR ENZIMA

Como se explicó anteriormente, se utilizaron dos enzimas, una procedente de páncreas de ternera (Pb) y otra de origen bacteriano *Pseudomonas* sp (Ps). Aunque las enzimas tienen una actividad equivalente para los esteres de colesterol se pudo comprobar que no sucedía lo mismo con los hidroxiesteres, mostrándose más eficaz la procedente de *Pseudomonas* sp para 25-hidroxicolesterol y 27- hidroxicolesterol. Este resultado puede verse en la Figura 5.4, donde se ve el cromatograma obtenido para una misma muestra.

Usando ambas enzimas en las mismas condiciones experimentales. La transformación a la forma libre con *Pseudomonas* sp era un 60% más para 25-hidroxicolesterol y un 34% más para 27-hidroxicolesterol en comparación con la enzima procedente páncreas de ternera (Pb). Esto puede ser debido al hecho de que *Pseudomonas* sp (Ps) esté mejor purificada al ser de origen bacteriano, ya que una buen nivel de pureza y la ausencia de contaminantes en los crudos enzimáticos asegura una mayor eficacia y reproducibilidad de los ensayos en los que se utilizan (Anthonsen y cols.,1995).

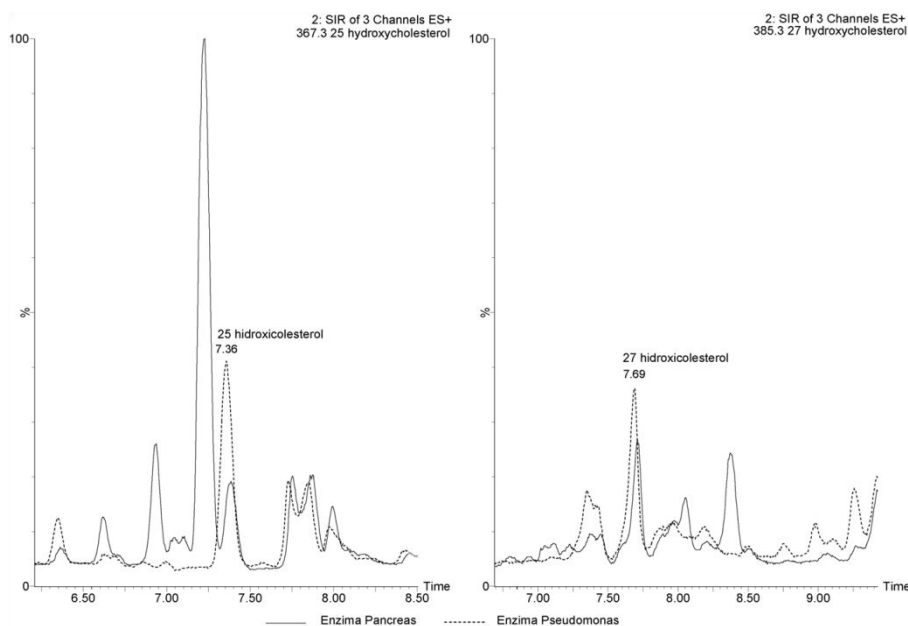


Figura 5.4. Cromatograma de reacciones realizadas con colesterol esterasa procedente de *Pseudomonas* sp y de páncreas bovino

4.4-OPTIMIZACIÓN CANTIDAD DE ENZIMA

Después de haber demostrado que a igualdad de condiciones experimentales la enzima de *Pseudomonas* funcionaba mejor que la de páncreas, se optimizó la cantidad de *Pseudomonas* a utilizar. Para ello se realizaron las dos hidrólisis alcalinas mencionadas en el apartado 4.1, y varias reacciones enzimáticas con diferentes cantidades de *Pseudomonas*: 1x, 2x, 4x (se utilizaron 1,2 y 4μL de stock de enzima respectivamente) y por último se decidió probar una mezcla de *Pseudomonas* y páncreas a 4x (2μL de cada una). Este experimento tenía la finalidad de acelerar el proceso de hidrólisis a través de la cantidad de enzima. Los resultados obtenidos para 25 y 27-hidroxicolesterol se muestran en la Figura 5.5. Se puede observar que la

enzima tiene una gran afinidad para hidrolizar los ésteres de 25-hidroxicolesterol siendo 4x la concentración más eficaz.

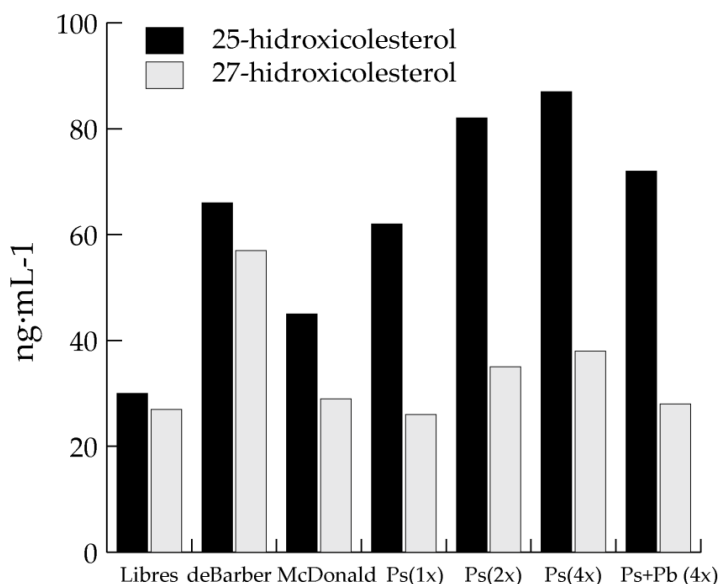


Figura 5.5. Optimización de la cantidad de enzima. Se comparan los métodos de hidrólisis alcalina con el método de hidrólisis enzimática utilizando en cada caso diferentes cantidades de Ps (1x; 2x; 4x) y de una mezcla Ps y Pb a 4x

En el caso del 27-hidroxicolesterol hay que destacar, que las dos enzimas (Pseudomonas y páncreas) hidrolizan este analito, pero se obtuvieron menores concentraciones, pese a aumentar las unidades de enzima, en comparación con la hidrólisis alcalina propuesta por (DeBarber y cols.,2008). Por otro lado, pueden observarse aumentos discretos en la concentración de este analito, conforme se aumenta la cantidad de enzima, lo que lleva a pensar que la afinidad de la enzima por este sustrato es peor, ya que las esterasas pueden mostrar diferente especificidad según el tipo y/o posición de los sustituyentes de los sustratos e incluso algunas pueden exhibir cierta estereoespecificidad (Anthonsen y cols.,1995).

4.5-DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE REACCIÓN.

4.5.1-Curvas cinéticas

Una vez optimizado el método con la adición de Triton X-100 y la cantidad de enzima a utilizar (4x), se realizó una cinética de reacción con tiempos comprendidos entre 0 y 240 para confirmar el tiempo final de la reacción, las muestras se procesaron como se explicó en el apartado 3.4.3. Los resultados se muestran en la Figura 5.6.

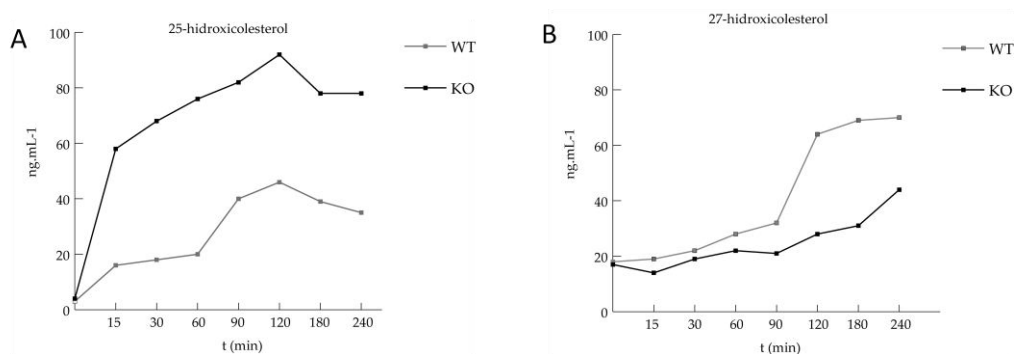


Figura 5.6 Cinética de reacción enzimática para determinar el tiempo final

Se observó que a partir de 120 minutos la cantidad de sustrato ya no aumenta y puede pensarse que comienzan a producirse degradaciones de 25-hidroxicolesterol, posiblemente por la acción de alguna proteína plasmática. Por ello, para determinar con precisión 25-hidroxicolesterol es importante mantener el tiempo final de 120 minutos o inferior además de procesar la muestra lo más rápidamente posible para evitarlo. Por otra parte, este efecto no se aprecia en el caso de 27-hidroxicolesterol, que en las mismas condiciones, es más estable en el tiempo que 25-hidroxicolesterol.

4.5.2-Desaparición del sustrato

Otra manera de saber que la reacción se había realizado por completo era a través de la desaparición del colesteril estearato, principal sustrato de la enzima. Este compuesto además, es el más abundante de los esteroides en las muestras de plasma y está a mayores concentraciones que otros esteroides esterificados, por lo que se determinó en todas las muestras procesadas. Los resultados se muestran en la Figura 5.7. Se aprecian niveles muy similares de este compuesto en el blanco, la hidrólisis alcalina de McDonald y la reacción enzimática 1x. Se podría considerar que en el resto de reacciones se ha consumido todo el colesterol esterificado y que por lo tanto, la reacción ha llegado a su punto final. Este experimento sirvió también para confirmar que la cantidad de enzima de *Pseudomonas* a utilizar más adecuada era 4x ya que para esa cantidad se ha consumido todo el colesteril estearato. Estos resultados nos indican que la hidrólisis alcalina propuesta por McDonald no hidroliza todos los ésteres de esteroles en modelos patológicos con elevadas concentraciones de ésteres de colesterol, como con las muestras procedentes de ratas *KO* al igual que la reacción con menor cantidad de enzima.

La elevada apolaridad de los ésteres de colesterol hace que presenten el inconveniente de necesitar tiempos cromatográficos muy largos para su determinación. Fue necesario prolongar el gradiente mostrado en la Tabla 5.1 desde el minuto 19 hasta el 45 con 100% de MeOH, para conseguir determinar el colesteril estearato, cuyo tiempo de retención es de 43,6 minutos.

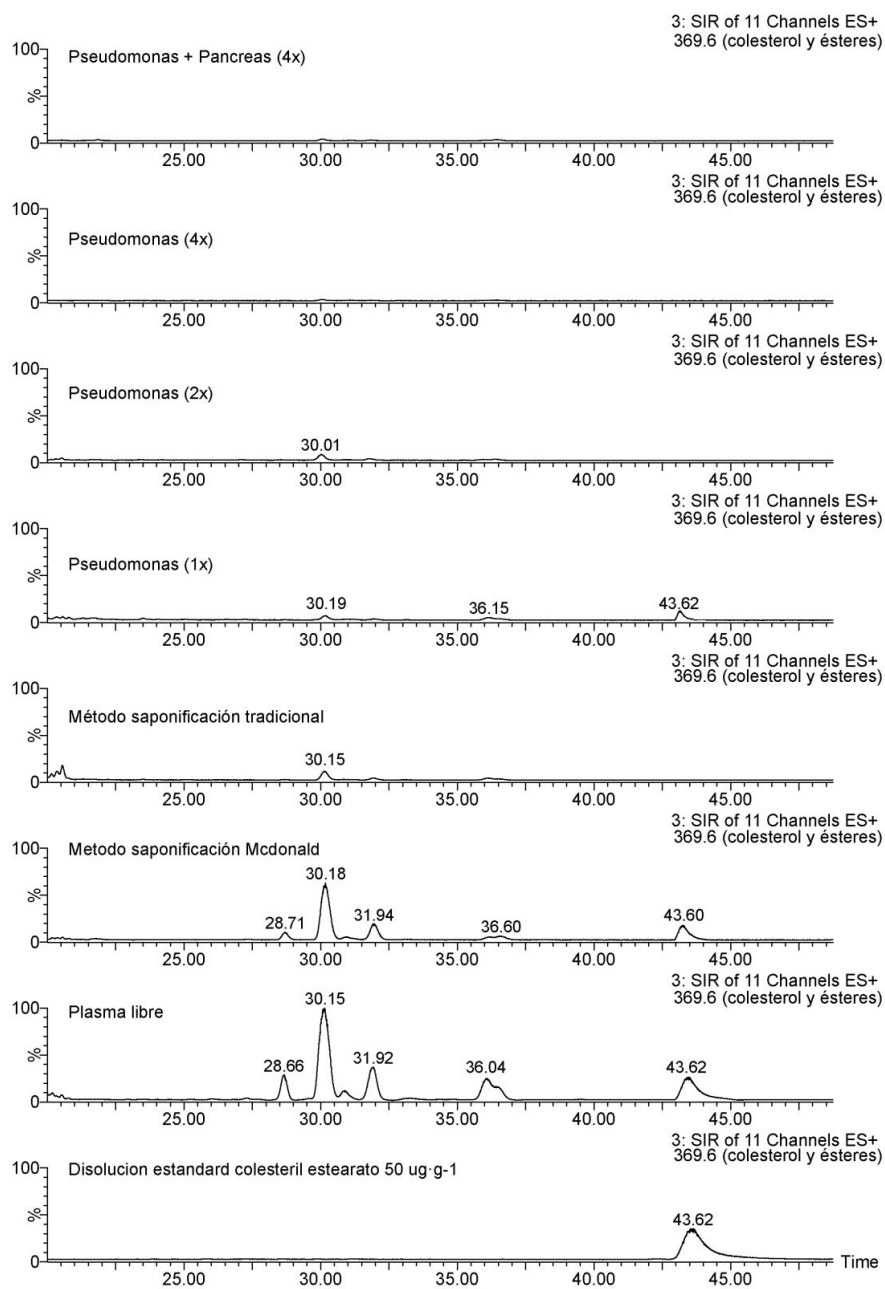


Figura 5.7. Evaluación del tiempo final de la reacción enzimática mediante desaparición de colesteril estearato. En la figura se ve una muestra de plasma de rata KO procesada mediante hidrólisis alcalina tradicional, específica de esteroides y enzimática a diversas cantidades

4.6-PARÁMETROS ANALÍTICOS

Una vez desarrollado el método enzimático para la determinación de la cantidad total de 25 y 27-hidroxicolesterol en plasma, se procedió al cálculo de los parámetros analíticos del mismo. Se determinó la curva de calibrado y el rango lineal, los límites de detección y cuantificación, la repetibilidad, la precisión intermedia, la eficacia global del proceso y la exactitud. Los resultados se resumen en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Parámetros analíticos del método enzimático para hidroxiesteroles totales

	25- OH	27- OH
Coefficiente de correlación (r^2)	0,998	0,999
Intervalo lineal ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	7-88	20-200
Límite de detección ($\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$)	12	15
Límite de cuantificación ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	40	49
Repetibilidad ($\%$, $n=6$)	5	6
Precisión intermedia ($\%$, $n=3$)	25	31
Eficacia del proceso ($\%$, $n=3$)	115	63
Exactitud ($\%$, $n=3$)	-15	37

Las curvas de calibrado para ambos analitos resultaron ser lineales en dos órdenes de magnitud con coeficientes de regresión que oscilaron entre 0,998 para 25-hidroxicolesterol y 0,999 para 27-hidroxicolesterol.

Los límites de detección y cuantificación se calcularon como sugiere la bibliografía (Miller,2002) y cómo se explica en el subapartado 3.7.2. Los límites de detección estuvieron en el rango de los $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ siendo 12 y 15 para 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol respectivamente. Los límites de cuantificación fueron $40\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ para 25-hidroxicolesterol y $49\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ para 27-hidroxicolesterol.

Los valores de repetibilidad resultaron ser los adecuados para este tipo de muestras biológicas y el nivel de concentración (Rambla-Alegre y cols.,2012). En ambos casos, estos valores fueron menores del 10%. La precisión intermedia fue del 25% para 25-hidroxicolesterol y 31% para 27-hidroxicolesterol.

Se optimizó el tratamiento de muestra hasta conseguir que los efectos matriz fueran casi inexistentes para 25-hidroxicolesterol (3%) y para 27-hidroxicolesterol (15%). Este cálculo se hizo teniendo en cuenta la concentración endógena de analitos del plasma.

Los valores de eficacia de extracción fueron superiores al 90% en ambos casos. Por último, se calculó la eficacia del proceso y fueron 115% y 63% para 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol respectivamente.

5-CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas de este capítulo se exponen a continuación:

- I. El método permite determinar los hidroxiesteros totales que se encuentran en la cubierta de las lipoproteínas al utilizar sólo la enzima en el plasma, o los hidroxiesteros totales que corresponden a los de la cubierta de la lipoproteína y los que se encuentran en el interior de la misma, con la simple adición de Triton X-100.
- II. El método supone una reducción en el tiempo de procesado de la muestra respecto a los métodos que utilizan hidrólisis alcalina. Esto se debe a evitar los pasos posteriores como la extracción, sequedad y redisolución de la muestra que se realizan tras la hidrólisis alcalina por lo que podemos procesar un mayor número de muestras en el mismo tiempo.
- III. Se confirma que la hidrólisis alcalina no es una reacción específica porque afecta a otros compuestos que hay en la muestra, provocando que se generen artefactos, lo que dificulta todavía más la cuantificación de los hidroxiesteros, que se encuentran a concentraciones muy bajas.

CAPÍTULO 6: BÚSQUEDA DE COMPUESTOS MARCADORES DE LA MUTACIÓN DEL GEN CYP7B1 EN HÍGADO DE RATA.

1-INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores se ha estudiado comportamiento del gen *Cyp7b1*. Se utilizaron ratas *WT* cuyo gen *Cyp7b1* es funcional y ratas enfermas o *KO* que carecen de actividad del gen y ratas plásmido, que eran ratas *KO* pero sometidos a terapia genética. Los animales *KO* muestran un aumento de los niveles de 25 y 27-hidroxicoolesterol en hígado. Este aumento también ha sido observado en plasma y riñón pero se piensa que existen más diferencias metabólicas entre ambos tipos de animales que todavía están pendientes de determinar (Reboldi y cols.,2014).

Actualmente, es posible obtener el perfil de los diferentes analitos que componen una muestra. Las fluctuaciones en sus niveles de concentración pueden relacionarse con múltiples factores como la dieta, fármacos, problemas genéticos o ambientales de forma que es posible caracterizar los efectos beneficiosos y adversos de estos factores (Nicholson y cols.,1999).

La identificación de estos analitos es posible gracias a la utilización de analizadores de masas de alta resolución, como son los analizadores de tiempo de vuelo (*TOF*), que acoplados a un analizador de cuadrupolo (*Q*), aumentan su capacidad de elucidación estructural. La Figura 6.1 muestra un esquema de un detector de masas *Q-TOF*.

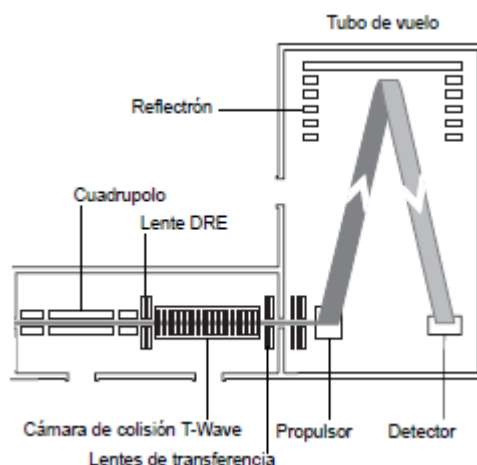


Figura 6.1. Esquema de un cuadrupolo unido a un analizador de tiempo de vuelo

Para el desarrollo de este capítulo, se utilizó un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas con un analizador de estas características. Hasta hace pocos años, los analizadores más comúnmente utilizados fueron los cuadrupolos o trampas de iones pero cuando se trabajaba

en modo barrido o full SCAN no proporcionaban la suficiente sensibilidad. Este hecho suponía un inconveniente en este tipo de estudios y por este motivo los analizadores de alta resolución, tales como el *TOF*, supusieron una gran ventaja para la elucidación estructural. Este analizador proporciona una sensibilidad hasta 100 veces mayor en modo SCAN. Además, la alta resolución proporcionada por el *TOF* en la medida de masas exactas permite asignar composiciones elementales de los iones que permite la identificación eficiente de compuestos en muestras complejas (Berry y cols.,2011; Jove y cols.,2013; Sharpe y cols.,2014).

Cuando se utiliza la espectrometría de masas en tándem, disponer de un cuadrupolo antes del analizador *TOF* supone una ventaja. El cuadrupolo filtra un ion específico al *TOF* para posteriormente enviarlo a una segunda cámara "cámara de colisión T-wave" en la que se aplica un voltaje y un gas de colisión (argón) produciéndose la fragmentación los iones procedentes del cuadrupolo.

Posteriormente, los fragmentos de los iones pasan al *TOF* donde un pulso de voltaje alto, acelera ortogonalmente los iones por el tubo de vuelo y un reflectrón, los refleja de nuevo hacia el detector. Los iones con diferentes relaciones masa/carga (m/z), llegan al detector a tiempos diferentes permitiendo la creación de un espectro de masas de alta resolución.

Los experimentos llevados a cabo en este capítulo persiguen obtener, nuevas huellas bioquímicas útiles para poder relacionarlas con el metabolismo ampliando así el conocimiento existente. Además este tipo de análisis permiten obtener gran cantidad de información utilizando poca cantidad de

muestra. Sin embargo, estas determinaciones son un reto analítico considerable debido a la naturaleza lábil de estos compuestos, el amplio rango de concentraciones que presentan en las muestras y la complejidad química de sus estructuras (Fiehn,2002; Whitfield y cols.,2004).

Todos estos análisis dan lugar a un conjunto de datos complejos que requieren de softwares específicos basados en la quimiometría para su interpretación. Los métodos de análisis estadístico multivariante proporcionan una manera de optimizar la extracción de la información contenida en los cromatogramas y espectros de masas de las muestras analizadas.

Cuando se trata de analizar una serie de perfiles, resulta muy útil la aplicación de lo que se denomina métodos basados en la proyección. Los métodos de proyección convierten tablas de datos multidimensionales en modelos bidimensionales. Esto permite detectar agrupaciones y tendencias, ya que los puntos que se encuentran cercanos corresponden a perfiles relativamente similares. De forma opuesta, puntos que se encuentran alejados unos de otros presentan descriptores muy diferentes (Wold y cols.,1984; Holmes y cols.,1998).

En este capítulo, se trabajó con el análisis de componentes principales *PCA* y el análisis discriminante de regresión ortogonal en mínimos cuadrados parciales *OPLS-DA* (Trygg y cols.,2002; Jolliffe,2005).

El análisis *PCA* es un modelo estadístico que se emplea para revelar la estructura interna de un conjunto de datos sin que medie ningún tipo de

conocimiento previo del sistema. Este modelo describe las relaciones de las muestras agrupándolas por sus similitudes y diferencias.

Por otro lado, para el caso de las muestras biológicas y de manera complementaria al *PCA*, se utiliza el análisis *OPLS-DA*. Este análisis permite comparar dos tipos de muestras y extraer los marcadores estadísticamente importantes que marcan las diferencias. Estos marcadores se escogen con la ayuda de la gráfica *S-plot* (score-plot) del modelo *OPLS-DA*. Los marcadores que quedan fuera del grupo central, son los que se seleccionan ya que informan de las diferencias entre ambos grupos (Tapp y cols.,2009).

Dependiendo del tipo de análisis que se esté desarrollando, se puede requerir la identificación de los metabolitos presentes en las muestras biológicas analizadas. Este objetivo puede alcanzarse mediante la comparación de espectros obtenidos con los existentes en las diferentes bases de datos: LipidMAPS (<http://lipidMAPS.org>), ChemSpider(<http://www.chemspider.com>), SciFinder (<http://www.scifinder.cas.org>).

En muchas ocasiones un compuesto puede quedar identificado por comparación de espectros pero, en otras no hay posibilidad ya que estas bases de datos siguen en desarrollo y no hay identificación posible para todos los compuestos encontrados.

2-OBJETIVOS

El objetivo del capítulo es la búsqueda de nuevos marcadores de la mutación del gen *Cyp7b1*.

Para ello se han definido los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar los marcadores más representativos de las diferencias entre animales *KO* y *WT* en base a los resultados del análisis de los datos por *PCA* y *OPLS-DA*.
- Identificar los marcadores asociados a la mutación del gen *Cyp7b1* mediante la determinación de la composición elemental, y comparación de los espectros de fragmentación con los existentes en las principales bases de datos.

3-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1-MATERIALES Y REACTIVOS

Los estándares utilizados fueron 25-hidroxicolesterol (pureza 99%, Chemical Abstract Service identification number: 2140-46-7), 27-hidroxicolesterol (99%, 20380-11-1), y 25-hidroxicolesterol -26,26,26,27,27,27 (d6) (estándar interno, 99%,88247-69-2). Todos fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EEUU). El BHT (99%,128-37-0) fue adquirido en Sigma-Aldrich (Madrid, España). Los disolventes utilizados fueron metanol (calidad analítica para LC-MS, 67-56-1), cloroformo (calidad analítica para HPLC, 67-66-3) y hexano (96%; 110-54-3). Los disolventes provienen de Sharlab (Barcelona, España). El agua se suministró por un equipo Milli-Q Plus 186 de Millipore (Billerica, MS, EEUU).

Todas las disoluciones se prepararon a partir de disoluciones patrón conteniendo los compuestos en una concentración de $1000\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en metanol. Las disoluciones fueron conservadas a -20°C antes y después de su utilización.

Los cartuchos de extracción en fase sólida utilizados fueron MFE®-PAK amino (500mg/3mL) proporcionados por Análisis Vínicos (Tomelloso, CR España). La extracción se llevó a cabo utilizando un manifold de veinte muestras y aplicando vacío mediante una bomba.

3.2-INSTRUMENTACIÓN

Se utilizó una balanza analítica GR-202-EC A&D Instruments LTD (Tokio, Japón); un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA® T18 basic, Stauffen, Alemania); un agitador Rotacional (Barcelona, España); una centrífuga Selecta Centromix (Salamanca, España); Manifold, Waters (Milford, MA; EEUU) un Vórtex Velp Scientifica Instruments 50-60 Hz (Usmate, MB; Italia) y un baño de Ultrasonidos Branson 3510 MTH (Fredericksburg, VA, EEUU). Finalmente, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución *ACQUITY UPLC™ H-Class* acoplado a un espectrómetro formado por la combinación de un cuadrupolo y un tiempo de vuelo (*QTOF*) *Xevo G2* ambos de Waters (Milford, MA, EEUU).

3.3-MUESTRAS Y TRATAMIENTO DE MUESTRA

Las muestras utilizadas fueron procesadas tal cómo se explicó en el capítulo 3, en el apartado 3.3. El tratamiento de muestra que se realizó se detalló en el subapartado 3.4.1. El procedimiento *SPE* llevado a cabo fue el que se describió en el apartado 3.5.

3.4-ANÁLISIS POR LC-MS/QTOF

La fuente de ionización utilizada fue *ESI* en modo positivo y el analizador en modo sensibilidad. Para la elucidación estructural y la identificación de los nuevos marcadores es necesario trabajar en el modo de MS^E donde trabaja simultáneamente a baja y a alta energía en la celda de

colisión. En la función de baja energía (función 1) se determina la masa exacta del ión molecular y en la función de alta energía (función 2) se determina la masa exacta de los fragmentos (función 2)

Las condiciones instrumentales de la detección y el gradiente se adjuntan en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Parámetros utilizados para los análisis por LC-MS/QTOF

Columna	UPLC™ BEH C18 100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm	
Temperatura de la columna	40°C	
Temperatura de la muestra	10°C	
Volumen de inyección	10µL	
Fase móvil	Disolvente A	Metanol con ácido fórmico 0,1%(v/v)
	Disolvente B	Agua Milli-Q con ácido fórmico 0,1%(v/v)
	Caudal	0,300mL/min
	Tiempo(min)	Disolvente A(% v/v)
	0,00	50
	2,00	50
Gradiente	7,00	100
	13,00	100
	13,10	50
	17,00	50
Interfase	ESI	
Modo de detección	Full SCAN	
Ionización	positivo	
Voltaje del capilar	2,5kV	
Voltaje de cono	30V	
Caudal de gas de cono	20L/h	
Caudal de gas de desolvatación	650L/h	
Temperatura de desolvatación	450°C	
Temperatura fuente	125°C	
MS^E	15-30V	
Rango de masas	50-1200Da	

3.5-TRATAMIENTO DE LOS DATOS OBTENIDOS

Todas las inyecciones se realizaron por triplicado para comprobar la reproducibilidad del método de análisis. Para procesar los datos adquiridos se

ha utilizado el programa Markerlynx® y la ayuda del software Umetrics™ SIMCA® de Waters (Milford, MA, EE.UU). Markerlynx® extrae de los picos cromatográficos pares (masa/carga (m/z)-tiempos de retención (tr)) y realiza un análisis *PCA* para buscar una estructura en los datos. Posteriormente, se realiza un análisis *OPLS-DA* con el que se obtiene una gráfica *S-plot*. Este tipo de análisis nos ayuda a extraer los marcadores que reflejan las diferencias más importantes entre los grupos de muestras estudiados.

Tras la obtención de un listado de los marcadores se determina la fórmula molecular con la herramienta *Elemental Composition* del software MassLynx v.4.1. Esta herramienta, proporciona la fórmula molecular del ion basándose en el error de masa exacta (diferencia entre la masa medida y la masa de la fórmula propuesta) y en la huella isotópica. Es recomendable seleccionar los elementos químicos que pueden constituir al compuesto y no olvidarse del Na y K por ser elementos presentes en la fase móvil y que a menudo forman aductos con las moléculas.

Las fórmulas moleculares propuestas se buscan en las bases de datos tales como LipidMAPS, Chempider y Scifinder, obteniendo así los candidatos. Para finalizar y confirmar los candidatos propuestos se utiliza el programa MassFragment®, que permite asociar los fragmentos detectados en el espectro del compuesto con la estructura del candidato propuesto.

4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 6.2 se muestra el esquema seguido para la búsqueda de marcadores. Se comenzó analizando los extractos de hígado por LC-MS/QTOF. Estos fueron preparados por el método de Folch (Folch y cols.,1957), que permite obtener un perfil amplio de compuestos (predominantemente lípidos) en su forma nativa.

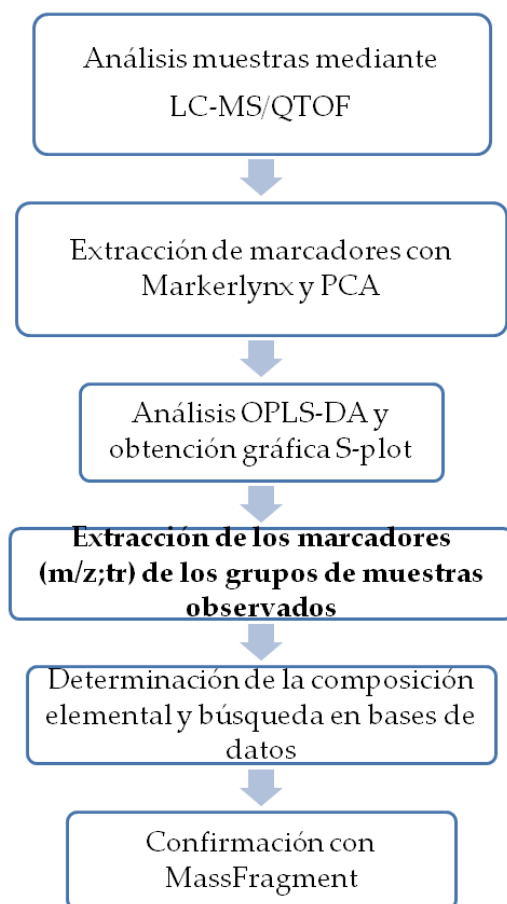


Figura 6.2. Esquema de los pasos realizados para la búsqueda de marcadores

4.1-ANÁLISIS MEDIANTE PCA

4.1.1-Hígado

El objetivo de este primer análisis era obtener una visión global de todas las muestras de hígado y conseguir discriminar las diferencias entre individuos *WT* y *KO*. En este primer estudio se utilizaron 5 muestras *WT* en condiciones de ayuno, 11 muestras *KO* en ayuno, 6 muestras *KO* con plásmido en ayuno, 8 muestras *WT* en condiciones postprandial (tras 8 horas de la ingesta de 5mL de aceite oliva virgen extra), y 14 muestras *KO* postprandial. Los resultados se muestran en la Figura 6.3

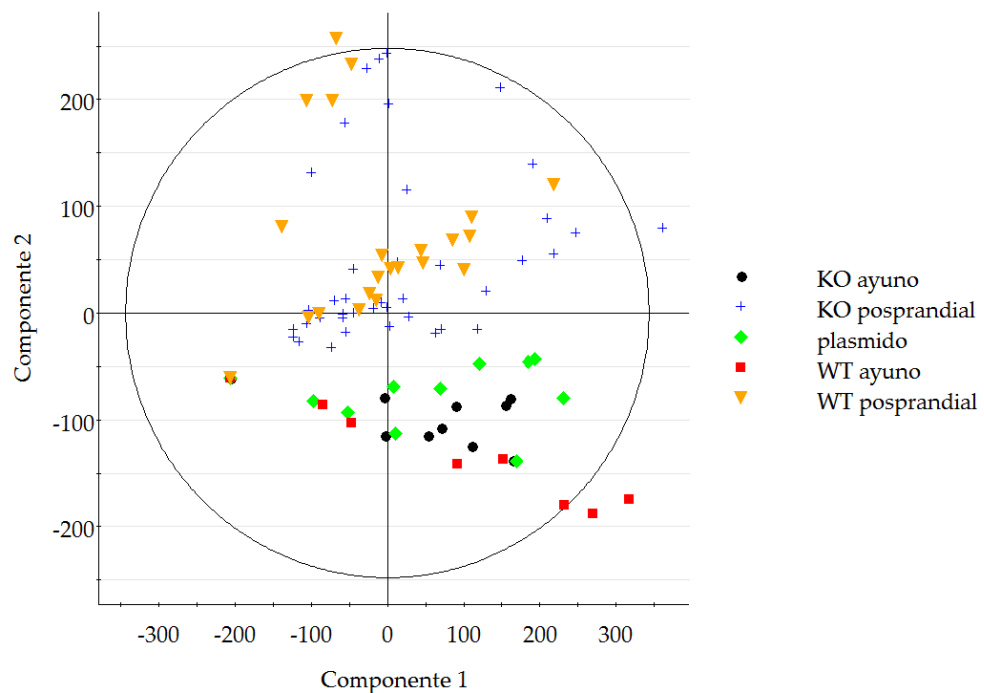


Figura 6.3. Gráfica obtenida del PCA en la que se muestra la distribución de todas las muestras de hígado y la relación que existe entre ellas

Se observó una separación entre las muestras en condiciones de ayuno (situadas en el cuadrante inferior derecho) y las muestras en condiciones postprandiales (distribuidas entre los cuadrantes restantes). Este resultado apoyó la idea del cambio que se produce en el metabolismo de los animales tras la ingesta de alimento. Estos resultados ya se mostraron en trabajos anteriores donde se observaron cambios importantes en la composición lipídica del hígado como un considerable aumento de los triglicéridos y el colesterol además de cambios en la composición de los fosfolípidos de las partículas *HDL* (Martinez-Beamonte y cols.,2013) .

En esta misma Figura 6.3, las muestras con plásmido (en situación de ayuno) se agrupan en la parte central del cuadrante inferior derecho y no se apreciaban diferencias con las muestras *KO* ni *WT*. Se hizo entonces un análisis mediante *PCA*, incluyendo únicamente las muestras de ayuno largo, con la finalidad de ver más claras las diferencias al considerar solamente esta condición. Los resultados se muestran en la Figura 6.4. Se observó que las muestras con plásmido se distribuían por el cuadrante superior izquierdo a diferencia de las *KO* que lo hacían entorno al origen de coordenadas y las *WT* que se agrupaban en el cuadrante inferior izquierdo. Este hecho podría explicar la peculiaridad de las muestras con plásmido. Son animales *KO* tratados genéticamente para que se comporten como individuos *WT*. Podría significar que el plásmido funcionó, pero al observarse también otras muestras de plásmido indistintamente agrupadas con *KO* y *WT* se confirmarían que no en todos los casos provoca el efecto deseado. Un resultado parecido, ya se había observado en los capítulos anteriores para 25 y 27-hidroxicolesterol.

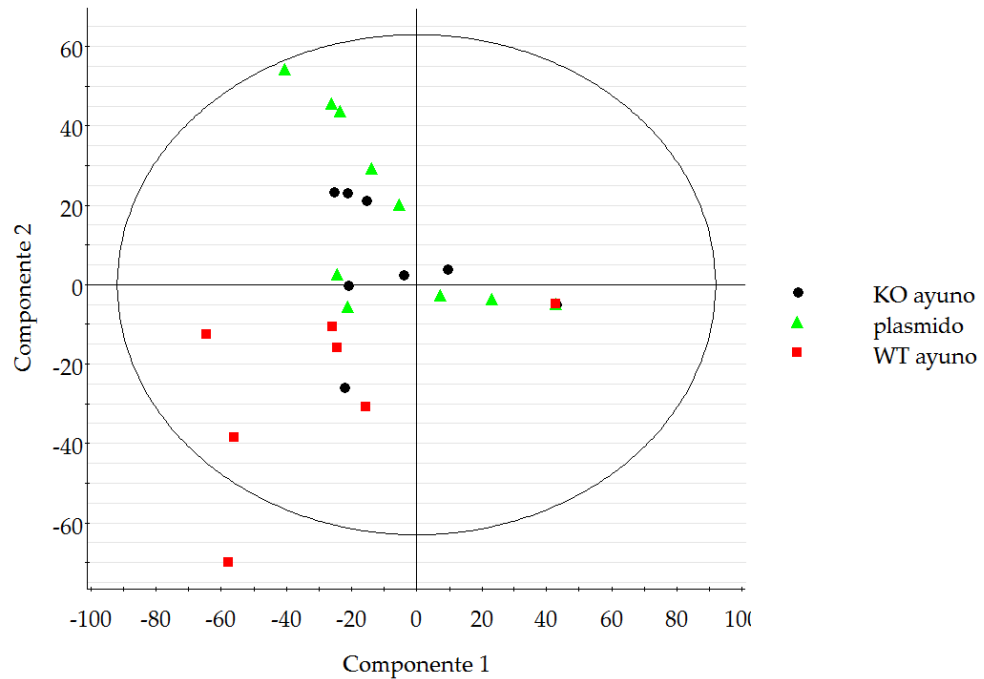


Figura 6.4. Gráfica obtenida del PCA en la que se muestra la distribución de las muestras de hígado KO, WT y plásmido en situación de ayuno

Se realizó un análisis *PCA* incluyendo únicamente las muestras postprandiales. Los resultados se muestran en la Figura 6.5. Las diferencias entre individuos *WT* y *KO* no fueron claras ya que aparecían ambos genotipos mezclados. Podría pensarse que tras la ingesta de alimento, hay muchos más metabolitos presentes y por este hecho no permite ver diferencias entre *KO* y *WT*.

Sin embargo, el análisis en situación de ayuno para muestras *WT* y *KO* dio como resultado un agrupamiento entre individuos *WT* que se distribuían entre los cuadrantes inferiores y los individuos *KO* que se distribuían entre los cuadrantes superiores como puede verse en la Figura 6.6.

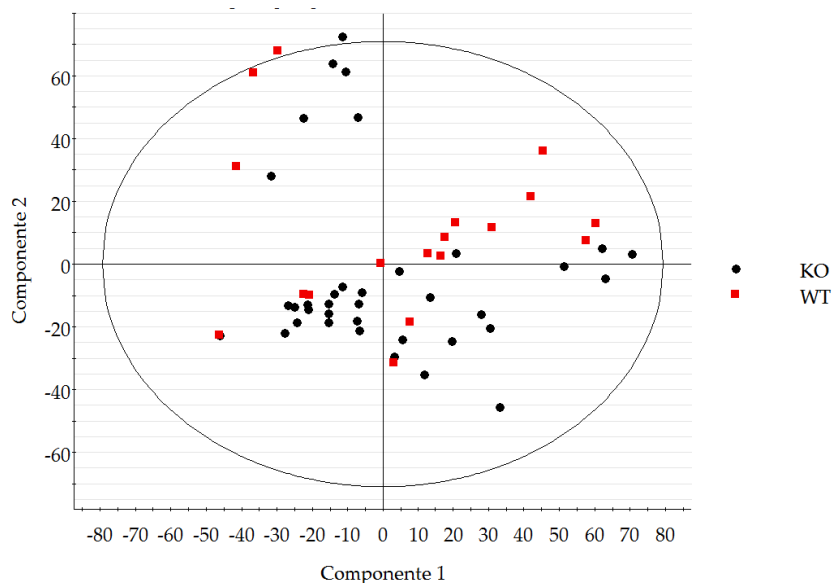


Figura 6.5. Gráfica obtenida del PCA en la que se muestra la distribución las muestras de hígado de animales KO y WT en situación postprandial

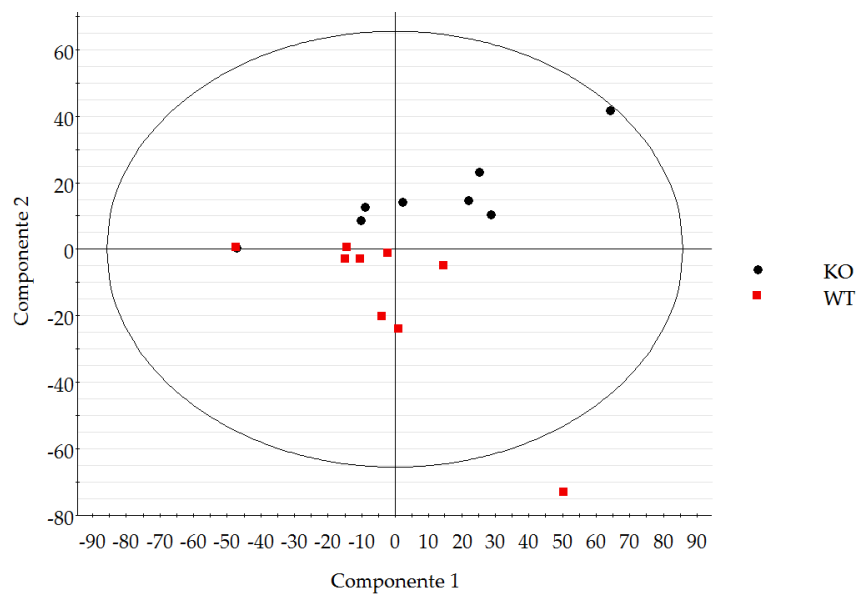


Figura 6.6. Gráfica obtenida del PCA en la que se muestra la distribución las muestras de hígado de animales KO y WT en situación de ayuno

4.1.2-Plasma

Del mismo modo que se procedió con las muestras del hígado se realizó un análisis *PCA* con todas las muestras de plasma. El objetivo de este análisis era obtener una visión global de todas las muestras y comparar los resultados con los obtenidos en hígado. En este primer estudio se utilizaron 5 muestras *WT* en condiciones de ayuno, 5 muestras *KO* en ayuno, 6 muestras *KO* con plásmido en ayuno, 6 muestras *WT* en condiciones postprandial, y 10 muestras *KO* postprandial. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados se muestran en la Figura 6.7

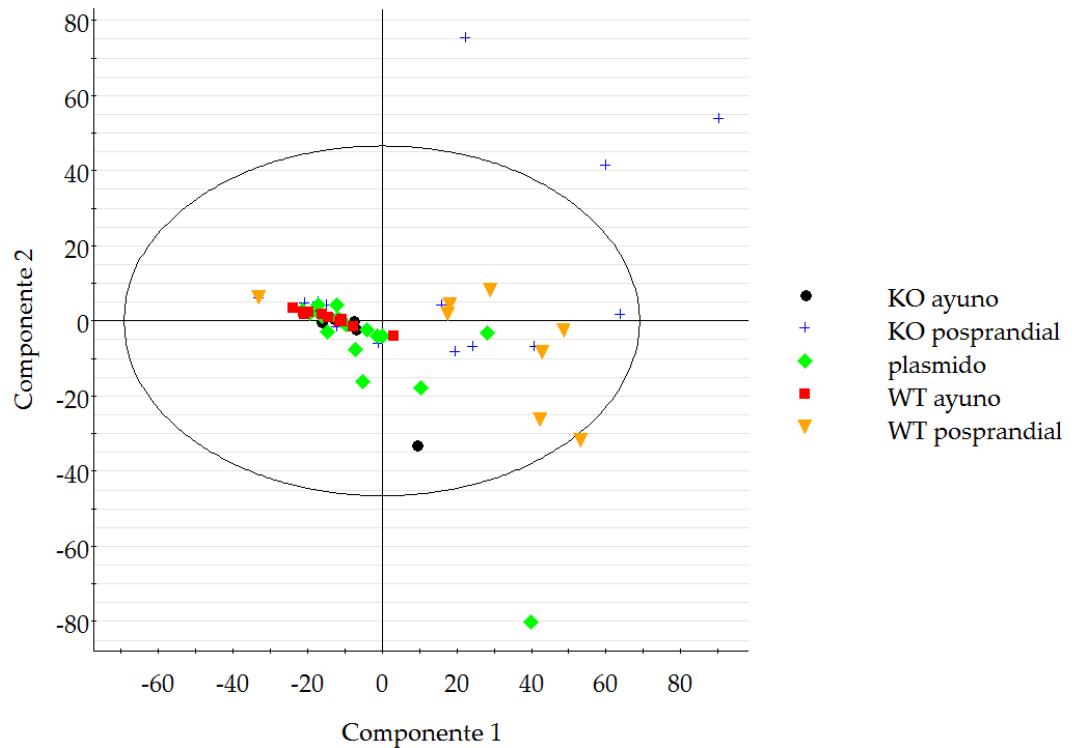


Figura 6.7. Gráfica obtenida del PCA en la que se muestra la distribución de todas las muestras de plasma y la relación que existe entre ellas

En esta gráfica se puede observar una separación entre situación de ayuno y postprandial, igual que sucedía en las muestras de hígado. Las muestras en situación de ayuno quedaron agrupadas en el origen de coordenadas, mientras que las muestras en situación postprandial se distribuyeron entre los dos cuadrantes situados a la derecha. Tal como ocurrió en hígado, no se vieron diferencias claras entre los individuos *KO*, *WT* y plásmido por eso se decidió realizar análisis *PCA* separadamente con estos tipos de muestras.

Tras realizar el *PCA* de las muestras de plasma de individuos *KO*, *WT* y plásmido y como se muestra en la Figura 6.8, se observó que algunas muestras de plásmido se distribuían entre los cuadrantes inferiores, siendo el inferior derecho dónde quedaban agrupadas junto a las *KO* y *WT*. En este caso, no se apreció una separación tan clara como en el hígado, incluso entre individuos *KO* y *WT*.

Esta situación contrastaba con lo que se había observado en hígado dónde si se vieron tres grupos diferentes. De modo que en este punto era importante determinar si realmente había una separación entre individuos *KO* y *WT*, por eso se realizó un análisis *PCA* de ambos tipos de muestras en situación de ayuno. Los resultados se muestran en la Figura 6.9. Finalmente, se pudo comprobar que existía esa separación entre ambos tipos de animales *KO* y *WT*. Entonces, los resultados observados en la Figura 6.8 se explicaban por la condición especial de los animales con plásmido, ya que son individuos *KO* pero se les ha tratado genéticamente para que se comporten como individuos *WT*.

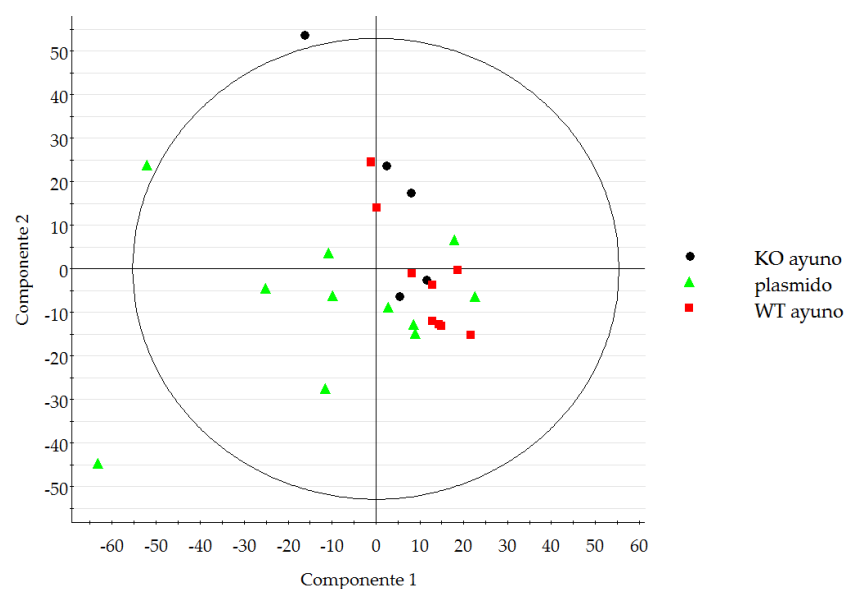


Figura 6.8. Gráfica obtenida del PCA en la que se muestra la distribución de las muestras de plasma KO , WT y plásmido en situación de ayuno

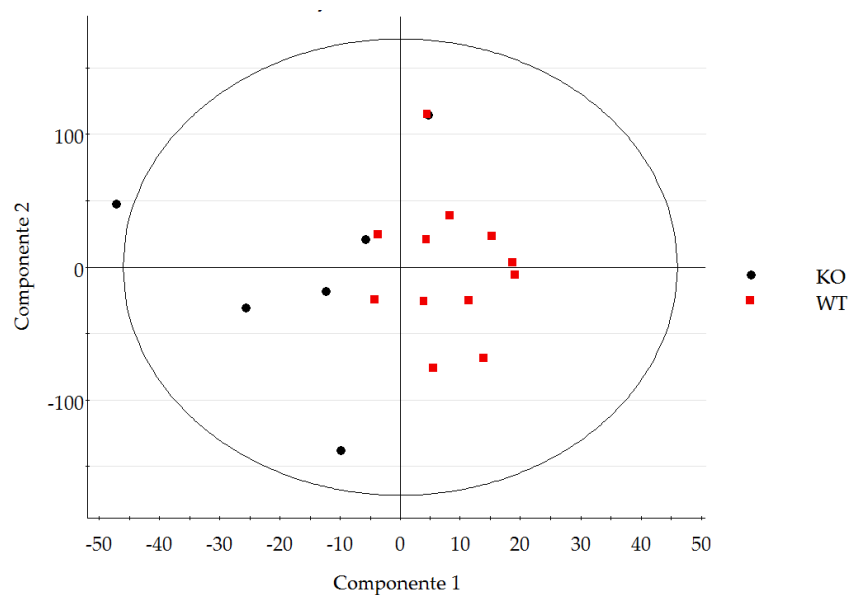


Figura 6.9. Gráfica obtenida del PCA en la que se muestra la distribución de las muestras de plasma KO y WT en situación de ayuno

A diferencia de los resultados obtenidos en situación postprandial para individuos *KO* y *WT* en hígado, en plasma sí que se observaron diferencias entre ambos tipos de animales. Como muestra la Figura 6.10, los individuos *KO* se agruparon en el cuadrante superior izquierdo. Mientras que los individuos *WT* lo hicieron en el cuadrante superior derecho. Puede pensarse que la situación postprandial afecta más al hígado que al plasma, ya que el hígado es el centro metabólico del organismo.

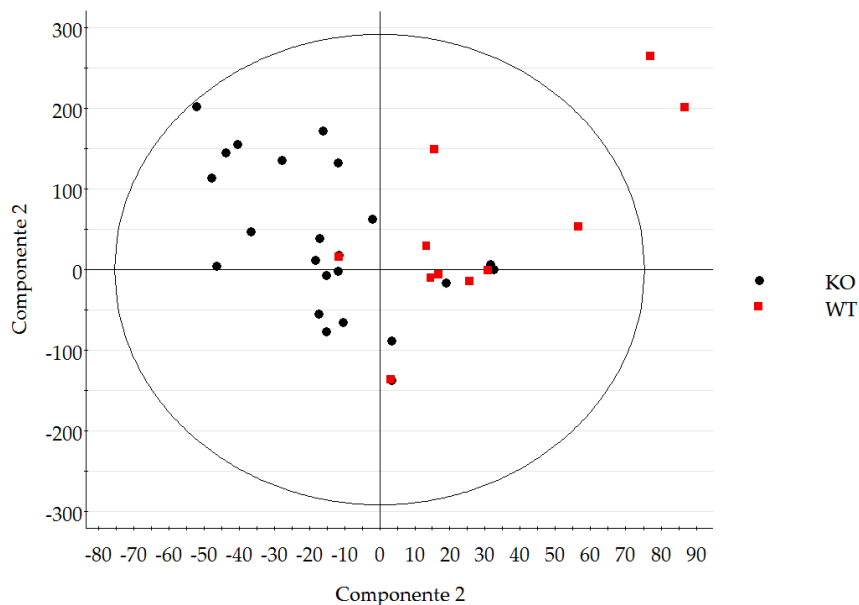


Figura 6.10. Gráfica obtenida del PCA en la que se muestra la distribución las muestras de animales *KO* y *WT* en situación postprandial

Una vez analizadas todas las muestras de hígado y plasma y de haber obtenido una visión general de lo que sucede en cada matriz en las situaciones estudiadas, el estudio se centró en obtener nuevos marcadores de la mutación del gen *Cyp7b1* en hígado, que es el principal órgano de su actuación.

4.2-ANÁLISIS MEDIANTE OPLS-DA

Ya que parecía existir una discriminación entre muestras de hígado *WT* y *KO* en ayuno como mostró el *PCA* de la Figura 6.6, se realizó un análisis *OPLS-DA* para las diferencias entre los dos grupos. Al seleccionar del *PCA* ambos tipos de muestras se obtuvo la gráfica de la Figura 6.11.

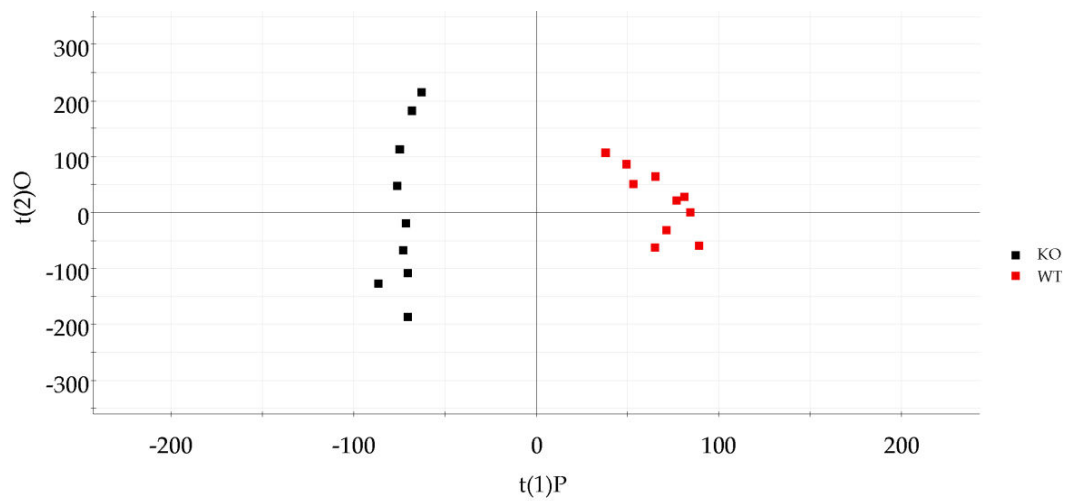


Figura 6.11. Gráfica obtenida del OPLS-DA en la que se muestra la distribución de las muestras WT (rojo) frente a las KO (negro)

Las diferencias entre *WT* y *KO* se aprecian con mayor claridad que en el análisis *PCA*, el análisis confirma la idea de que la mutación está introduciendo cambios significativos en los animales y abre la posibilidad de encontrar otros marcadores diferentes a los ya conocidos. En cuanto a la dispersión de las mismas, se ve que hay menor variabilidad entre las muestras *WT* (más agrupadas en torno al eje horizontal) que en *KO* (distribuidas entre el cuadrante superior y el inferior).

La extracción de los marcadores se realizó mediante la gráfica *S-plot* obtenida del análisis *OPLS-DA*. Los resultados se muestran en la Figura 6.12.

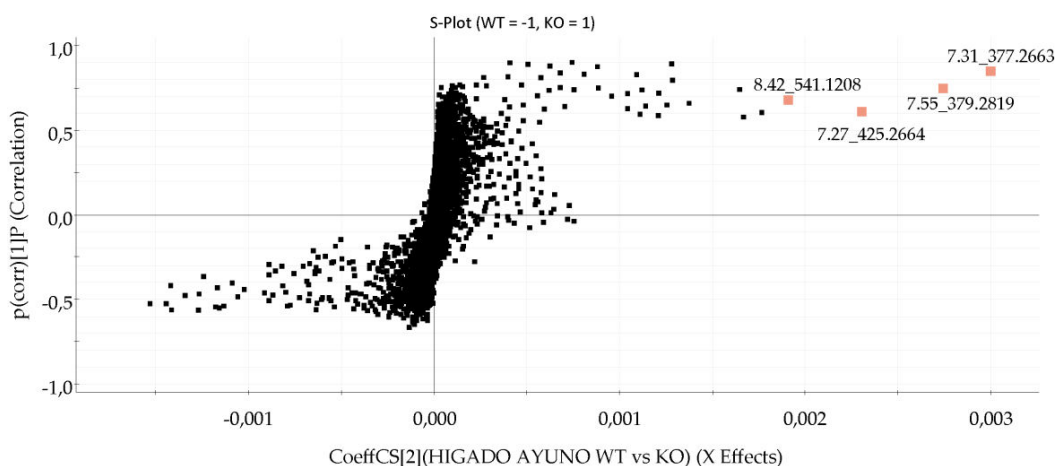


Figura 6.12. Gráfica S-plot del análisis OPLS-DA para muestras WT vs KO

Se seleccionaron los cuatro más relevantes de las muestras *KO* que quedaron fuera del grupo central, en la región llamada de alta contribución estadística (más alejados del origen de coordenadas, hacia la derecha) y de alta confianza (más alejados del origen de coordenadas, hacia arriba).

Al tratarse de muestras biológicas, los marcadores encontrados no fueron exclusivos de los individuos de *KO* sino que fueron compuestos que también estaban presentes en individuos *WT*. Esto ya observó en los capítulos anteriores para los casos de 25 y 27-hidroxicolesterol, ya que son compuestos que se encuentran en ambos tipos de individuos pero con diferencias en su concentración.

Esta circunstancia queda representada gráficamente en la Figura 6.13, donde puede verse la concentración media de los marcadores encontrados en ambos tipos de animales.

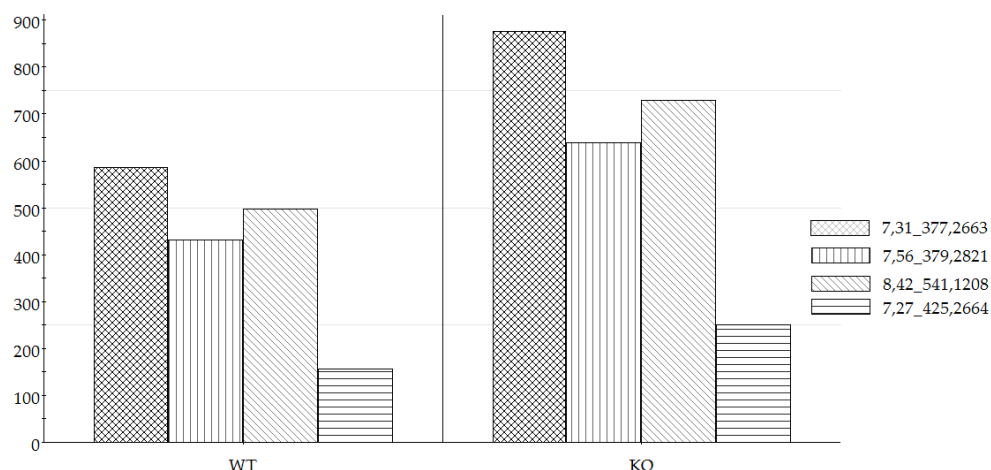


Figura 6.13. Gráfica que muestra la existencia de marcadores en ambos tipos de muestra pero con diferente presencia entre individuos WT y KO

Así quedó confirmado que no estamos frente a la ausencia/presencia de un marcador determinado que informa de individuos enfermos, sino ante la presencia de niveles distintos de un mismo marcador.

4.3-BÚSQUEDA DE COMPUESTOS CANDIDATOS

4.3.1-Cálculo de la composición elemental

Una vez obtenidos los marcadores más representativos de la mutación, se extrajeron los espectros del pico al tiempo de retención indicado para cada marcador.

- 7,31_377,2662

En el espectro del marcador 7.31_377.2662 observamos la forma $[M+Na]^+$ y también la correspondiente a la forma sin sodio $[M+H]^+$ ($m/z=355,2842$). Por tanto la composición elemental preferida sería $C_{21}H_{38}O_4$. Los resultados pueden verse en la Figura 6.14.

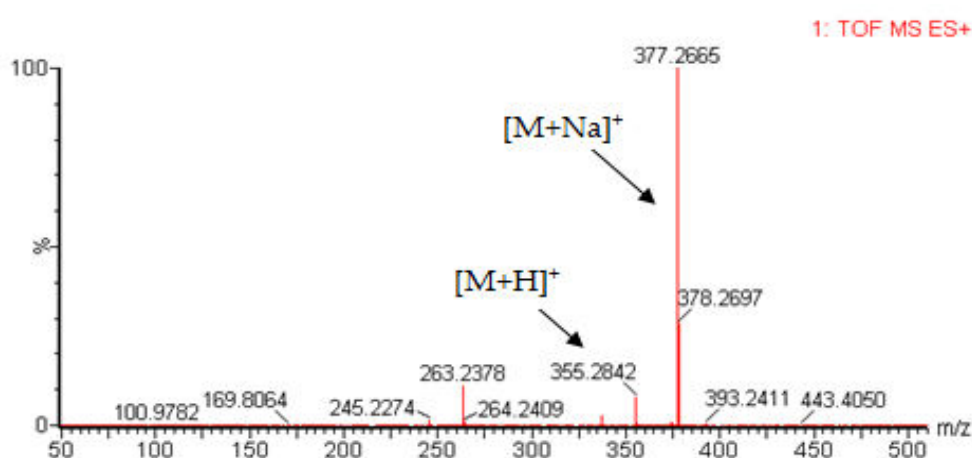


Figura 6.14. Espectro de baja energía del marcador 7,31_377,2662

- 7,55_379,2819

En el espectro del marcador 7,55_379,2819 observamos la forma $[M+Na]^+$ y también la correspondiente a la forma sin sodio $[M+H]^+$ ($m/z=357,3010$). Por tanto la composición elemental preferida sería $C_{21}H_{40}O_4$. Los resultados pueden verse en la Figura 6.15

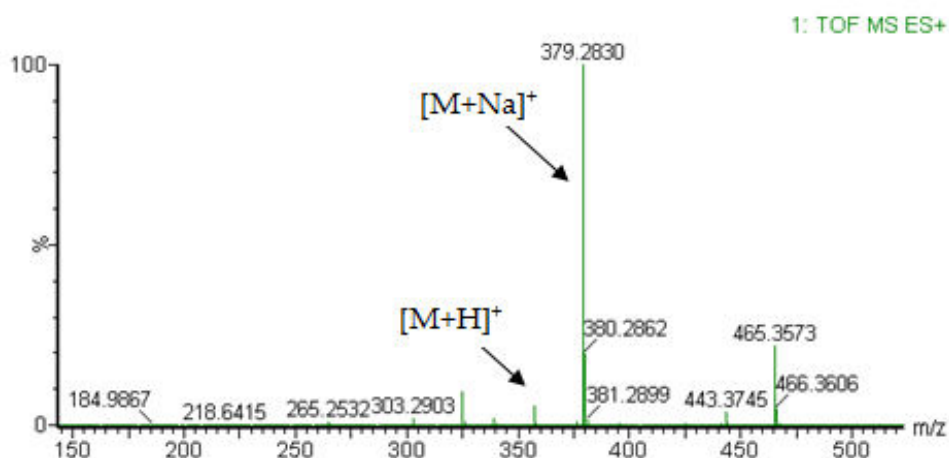


Figura 6.15. Espectro de baja energía del marcador 7,55_379,2819

- 7,27_425,2664

En el espectro del marcador 7,27_425,2664 observamos la forma $[M+Na]^+$ y también la correspondiente a la forma sin sodio $[M+H]^+$ ($m/z=403,2832$). Por tanto la composición elemental preferida sería $C_{25}H_{38}O_4$. Los resultados pueden verse en la Figura 6.16.

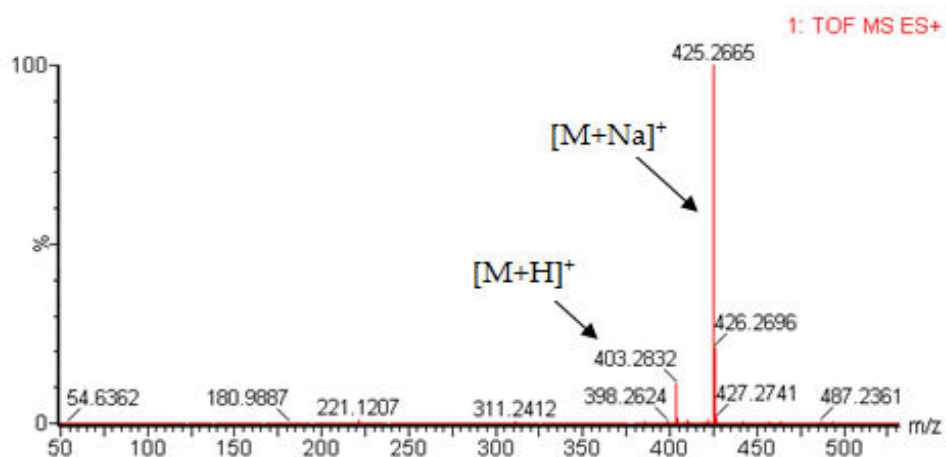


Figura 6.16. Espectro de baja energía del marcador 7,27_425,2664

Posteriormente, se buscaron las fórmulas moleculares a través de la aplicación *Elemental Composition*. Una vez seleccionadas las fórmulas moleculares se buscó información en las bases de datos.

Un resumen de toda la información recopilada se encuentra en la Tabla 6.3. Para cada marcador se muestra la fórmula molecular y su Δm (diferencia entre masa exacta medida y la masa teórica de la fórmula molecular propuesta).

Se encontraron compuestos para todos los marcadores excepto para el (8,42_541,1208). En este caso, las fórmulas propuestas no dieron ningún resultado tras buscar en todas las bases de datos.

Tabla 6.3 Marcadores encontrados con su fórmula propuesta, su masa teórica y su Δm

Marcador	Ion	Fórmula propuesta	Masa medida (Da)	Masa teórica (Da)	Δm (Da)	Identificador LipidMAPS
7,31_377,2662	[M+Na] ⁺	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	377,2694	377,2668	2,6	LMFA01170125
						LMFA03010073
						LMGL01010006
7,55_379,2819	[M+Na] ⁺	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	379,2835	379,2824	1,1	LMFA01170036
						LMGL01010004
						LMG101010005
7,27_425,2664	[M+Na] ⁺	C ₂₅ H ₃₈ O ₄	425,2664	425,2668	-0,2	LMG01010024
						LMGL01010027
						LMPR0105060001
8,42_541,1208	[M+Na] ⁺	C ₃₉ H ₁₈ O ₂	541,1223	541,1204	1,9	LMST03020025
		C ₃₂ H ₂₂ O ₇		541,1263	-4,0	
		C ₁₄ H ₃₀ O ₂₀		541,1228	-0,5	

4.3.2-Confirmación de los candidatos encontrados: MassFragment

Como se ha explicado anteriormente, para comprobar que los candidatos encontrados se trataban de los compuestos propuestos, se procedió a la identificación mediante la utilización del programa MassFragment®. Este programa trabaja comparando las masas exactas de los fragmentos de cada candidato con las obtenidas experimentalmente para cada precursor. Como la fragmentación de un ión precursor genera varias composiciones estructurales posibles, MassFragment® aplica una “puntuación” o “score” a cada enlace fragmentado. Esta puntuación se basa en una serie de cálculos de probabilidades. En líneas generales, cuanto menor sea la puntuación, más plausible la estructura propuesta.

A continuación se muestra la identificación de algunos compuestos utilizando esta técnica:

- 7,31_377,2662

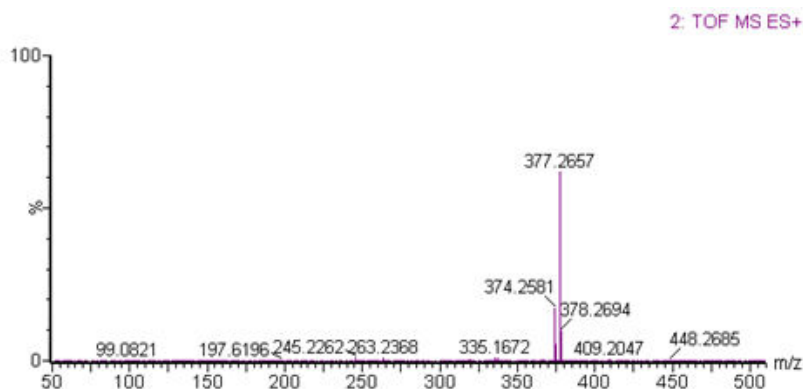


Figura 6.17. Espectro de alta energía del marcador 7,31_377,2662

Los resultados obtenidos del espectro de fragmentación de la $m/z=377,2665$ se muestran en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4 Resultados obtenidos tras el procesamiento por MassFragment de la fórmula $C_{21}H_{38}O_4$

Candidato	m/z fragmento	(Δm) mDa	Fórmula	Pérdida fragmento	Enlaces rotos	Score
LMFA 01170125	263,2378	0,3	$C_{18}H_{31}O$	C_3H_8O	2	1,5
	337,2730	1,4	$C_{21}H_{37}O_3$	H_2O	1	0,5
	245,2274	0,1	$C_{18}H_{29}$	$C_3H_{10}O_4$	3	3
	319,1940					
LMFA 03010073	263,2378	0,3	$C_{18}H_{31}O$	C_3H_8O	3	2
	337,273	1,4	$C_{21}H_{37}O_3$	H_2O	1	1
	245,2274	0,1	$C_{18}H_{29}$	$C_3H_{10}O_4$	4	2,5
	319,1940					
LMGL 01010006	263,2378	0,3	$C_{18}H_{31}O$	C_3H_8O	1	0,5
	337,2730	1,4	$C_{21}H_{37}O_3$	H_2O	1	0,5

Dentro de los tres candidatos posibles para esta fórmula molecular, el que mejores resultados dio fue LMGL01010006, 1-(9Z,12Z-octadecadienoil)-rac-glicerol. La estructura se muestra en la Figura 6.18. Como se verá a continuación, tiene una estructura muy similar a la de LMGL0101004 y LMGL0101005 del marcador 7.55_379,2819.

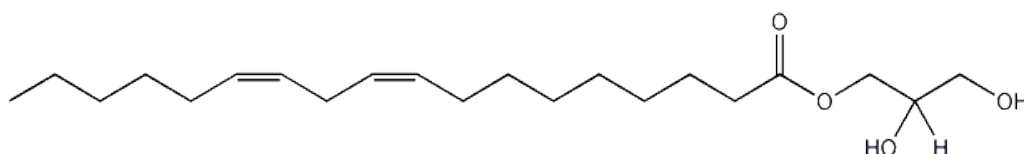


Figura 6.18. Estructura del compuesto 1-(9Z,12Z-octadecadienoil)-rac-glicerol

- 7,55_379,2819

En el espectro del marcador 7,55_379,2819 observamos la forma $[M+Na]^+$ y también la correspondiente a la forma sin sodio $[M+H]^+$ ($m/z=357,3010$). Por

tanto la composición elemental preferida sería $C_{21}H_{40}O_4$. Los resultados pueden verse en la Figura 6.19.

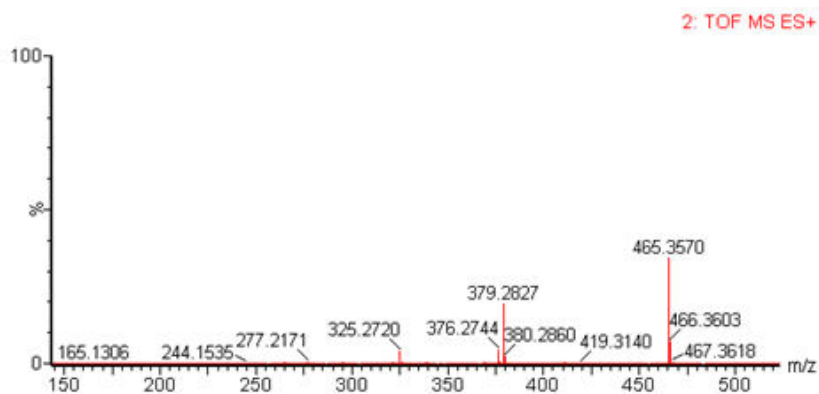


Figura 6.19. Espectro de alta energía del marcador 7,35_379,2819

Los resultados obtenidos del espectro de fragmentación de la $m/z=379,2830$ se muestran en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5. Resultados obtenidos tras el procesamiento por MassFragment de la fórmula $C_{21}H_{40}O_4$

Candidato	m/z fragmento	(Δm) mDa	Fórmula	Pérdida fragmento	Enlaces rotos	Score
LMFA 01170036	339,2910	0,9	$C_{21}H_{39}O_3$	H_2O	1	0,5
	265,2530	0,3	$C_{18}H_{33}O$	C_3H_8O	2	1,5
LMGL 01010004	339,2910	0,9	$C_{21}H_{39}O_3$	H_2O	1	0,5
	265,2530	0,3	$C_{18}H_{33}O$	C_3H_8O	1	0,5
	277,2170	0,2	$C_{18}H_{29}O_2$	$C_3H_{12}O_2$	2	2
LMG 101010005	339,2910	0,9	$C_{21}H_{39}O_3$	H_2O	1	0,5
	265,2530	0,3	$C_{18}H_{33}O$	C_3H_8O	1	0,5
	277,2170	0,2	$C_{18}H_{29}O_2$	$C_3H_{12}O_2$	2	2
LMG 01010024	339,2910	0,9	$C_{21}H_{39}O_3$	H_2O	1	0,5
	265,2530	0,3	$C_{18}H_{33}O$	C_3H_8O	1	0,5
	277,2170	0,2	$C_{18}H_{29}O_2$	$C_3H_{12}O_2$	2	3

Dentro de los tres candidatos posibles para esta fórmula molecular, el que mejores resultados dio fueron LMGL01010004 y LMG101010005 1-(11E-octadecenoil)-rac-glicerol y 1-(9Z-octadecenoil)-rac-glicerol.

La estructura de los compuestos se muestra en la Figura 6.20. Puede verse que únicamente les diferencia la posición del doble enlace.

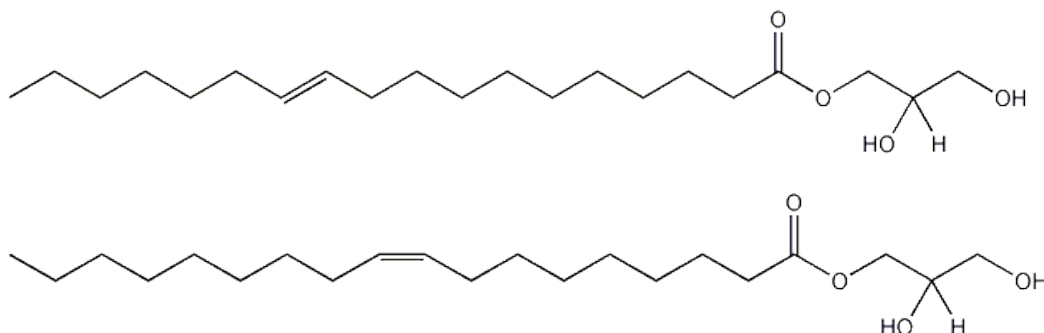


Figura 6.20. Estructura de los compuestos 1-(11E-octadecenoil)-rac-glicerol (superior) y 1-(9Z-octadecenoil)-rac-glicerol (inferior)

- 7,27_425,2664

En el espectro del marcador 7,27_425,2664 observamos la forma $[M+Na]^+$ y también la correspondiente a la forma sin sodio $[M+H]^+$ ($m/z=403,2832$). Por tanto la composición elemental preferida sería $C_{25}H_{38}O_4$. Los resultados pueden verse en la Figura 6.21.

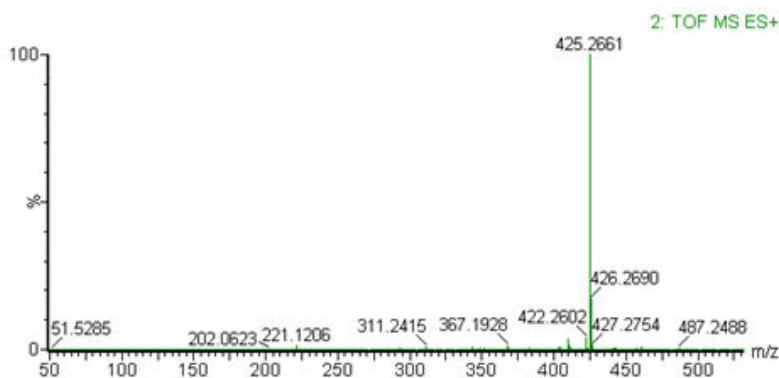


Figura 6.21. Espectro de alta energía del marcador 7,27_425

Los resultados obtenidos del espectro de fragmentación de la $m/z=425,2664$ se muestran en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6. Resultados obtenidos tras el procesamiento por MassFragment de la fórmula $C_{25}H_{38}O_4$

Candidato	m/z fragmento	(Δm) mDa	Fórmula	Pérdida fragmento	Enlaces rotos	Score
LMGL 01010027	209,1194	1,6	$C_{12}H_{17}O_3$	$C_{13}H_{22}O$	2	1,5
	184,111	1,2	$C_{10}H_{16}O_3$	$C_{15}H_{23}O$	2	2
	265,1969	1,3	$C_{20}H_{25}$	$C_5H_{14}O_4$	2	2
	385,2756	1,3	$C_{25}H_{37}O_3$	H_2O	1	0,5
LMPR 0105060001	385,2756	1,3	$C_{25}H_{37}O_3$	H_2O	1	0,5
LMST 03030025	265,1969	1,3	$C_{20}H_{25}$	$C_5H_{14}O_4$	4	3
	385,2756	1,3	$C_{25}H_{37}O_3$	H_2O	1	0,5
	293,2278	0,9	$C_{22}H_{29}$	$C_3H_{10}O_4$	3	2

En el caso de este marcador se observa muy poca fragmentación. Por este motivo resulta complicado obtener conclusiones de los espectros. El único compuesto que explica al menos uno de los fragmentos más intensos es el LMGL01010027 cuyo nombre sistemático es 2-(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoil)-sn-glicerol. Su estructura se muestra en la Figura 6.22. Puede observarse que es similar a los anteriores marcadores candidatos.

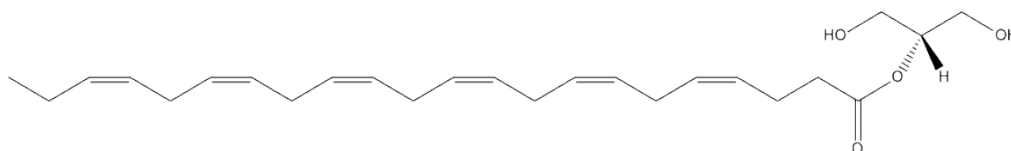


Figura 6.22. Estructura del compuesto 2-(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoil)-sn-glicerol.

Los compuestos encontrados pertenecen a la familia de los monoacilgliceroles que son componentes minoritarios de la mayoría de las plantas y de los tejidos animales. No suelen acumularse en los tejidos debido a sus fuertes propiedades tensoactivos, que hacen que tenga un efecto disruptivo en las membranas. También son los productos finales mayoritarios de la digestión enzimática de las grasas animales a nivel intestinal por acción de la lipasa pancreática. Estos compuestos son adquiridos directamente por las células intestinales y convertidos a triacilgliceroles a través de la ruta metabólica de los monoacilgliceroles antes de ser transportados a través de la linfa al hígado. (Kihira y cols.,1984; Roldan y cols.,1994; Mizuguchi y cols.,2001; Holtfrerich y cols.,2013).

5-CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas de este capítulo se resumen a continuación:

- I. La ingesta de alimento cambia los perfiles metabólicos de los animales tanto en hígado como en plasma.
- II. La terapia génica con el plásmido portador del gen *Cyp7b1* no está provocando los cambios esperados.
- III. Los individuos *WT* y *KO* mostraron diferentes niveles de concentración de analitos en situación de ayuno, tanto en hígado como en plasma.
- IV. Se proponen los siguientes marcadores en hígado de la mutación del gen *Cyp7b1*:
 - El ácido graso: 1-(9Z,12Z-octadecadienoil)-rac-glicerol.
 - Los compuestos 1-(11E-octadecenoil)-rac-glicerol y 1-(9Z-octadecenoil)-rac-glicerol.
 - El ácido graso 2-(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoil)-sn-glicerol.

SECCIÓN IV:
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado de esta Tesis se han obtenido las siguientes conclusiones:

- I. La utilización de los ultrasonidos en la etapa de la hidrólisis alcalina y el empleo de la cromatografía de líquidos y espectrometría de masas, reducen el tiempo de tratamiento de muestra para el análisis de esteroides en suero humano, respecto a los métodos que utilizan cromatografía de gases. Esta mejora se fundamenta en el uso de la energía aportada por un sistema de ultrasonidos y en suprimir la etapa de derivatización
- II. El sistema online desarrollado permite una automatización del proceso de limpieza de la muestra en el mismo sistema cromatográfico para el análisis de esteroides en suero humano.

Además, se ha demostrado que es posible trabajar con un sistema online con fases estacionarias no ortogonales.

- III. El 25-hidroxicolesterol se perfila como el principal marcador de la mutación del gen *Cyp7b1*, en hígado de rata. Este compuesto tiende acumularse más que el 27-hidroxicolesterol, tanto en situación de ayuno como en postprandial. Además, realizar análisis en situación postprandial resulta más complicado que en situación de ayuno largo ya que se observa una movilización de los sustratos que se traduce en una mayor complejidad de los resultados. Finalmente, con este método se ha sabido que el plásmido que se introdujo en los animales *KO* no ha dado resultados satisfactorios, salvo en dos casos aislados.
- IV. Siendo el 25-hidroxicolesterol el sustrato preferido de la enzima generada por el gen *Cyp7b1*, puede prescindirse de realizar una biopsia hepática y de la parte de homogeneizado del tejido durante el tratamiento de muestra, lo que facilitará el estudio de los individuos *KO* utilizando muestras de plasma de rata.
- V. Es posible realizar hidrólisis enzimáticas de hidroxiesteroles esterificados utilizando colesterol esterasas, en plasma de rata. Esta alternativa reduce el tiempo de procesamiento de la muestra respecto a los métodos tradicionales que utilizan hidrólisis alcalina. También evita la generación de artefactos relacionados con el medio básico y las altas temperaturas asociadas al proceso

convencional y mejora el rendimiento general al suprimir pasos intermedios.

- VI. Los individuos *KO* y *WT* mostraron diferentes niveles de concentración de analitos en situación de ayuno tanto en hígado como en plasma. Se han propuesto nuevos marcadores en hígado de la mutación del gen *Cyp7b1*.

SECCIÓN V:
BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abidi S.L.,(2004). 'Capillary electrochromatography of sterols and related steryl esters derived from vegetable oils'. *Journal of Chromatography A*. **1059** (1-2):199-208.

Aburuz S., J. Millership, L. Heaney, and J. McElroy,(2003). 'Simple liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges'. *Journal of Chromatography B*. **798** (2):193-201.

Altmann S.W., H.R. Davis, Jr., L.J. Zhu, X. Yao, L.M. Hoos, G. Tetzloff, S.P. Iyer, M. Maguire, A. Golovko, M. Zeng, L. Wang, N. Murgolo, and M.P. Graziano,(2004). 'Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption'. *Science*. **303** (5661):1201-1204.

Alvarez-Sanchez B., F. Priego-Capote, and M.D. Luque De Castro,(2009). 'Ultrasound-enhanced enzymatic hydrolysis of conjugated female steroids as pretreatment for their analysis by LC-MS/MS in urine'. *Analyst*. **134** (7):1416-1422.

Anthonsen H.W., A. Baptista, F. Drablos, P. Martel, S.B. Petersen, M. Sebastiao, and L. Vaz,(1995). 'Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution'. *Biotechnol Annu Rev*. **1** 315-371.

Appukuttan A., S.A. Kasseckert, S. Kumar, H.P. Reusch, and Y. Ladilov,(2013). 'Oxysterol-induced apoptosis of smooth muscle cells is under the control of a soluble adenylyl cyclase'. *Cardiovasc Res.* **99** (4):734-742.

Arrojo S., C. Nerín, and Y. Benito,(2007). 'Application of salicylic acid dosimetry to evaluate hydrodynamic cavitation as an advanced oxidation process'. *Ultrasonics Sonochemistry.* **14** (3):343-349.

Balinova A., R. Mladenova, and D. Shtereva,(2007). 'Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography-mass spectrometric and gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in crops'. *Journal of Chromatography A.* **1150** (1-2):136-144.

Bentayeb K., R. Batlle, C. Sánchez, C. Nerín, and C. Domeño,(2008). 'Determination of bile acids in human serum by on-line restricted access material-ultra high-performance liquid chromatography-mass spectrometry'. *Journal of Chromatography B.* **869** (1-2):1-8.

Bergstrom S. and O. Wintersteiner,(1942). 'Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution III. Quantitative studies on cholesterol'. *Journal of Biological Chemistry.* **145** (1):309-326.

Berry K.a.Z., J.A. Hankin, R.M. Barkley, J.M. Spraggins, R.M. Caprioli, and R.C. Murphy,(2011). 'MALDI Imaging of Lipid Biochemistry in Tissues by Mass Spectrometry'. *Chemical Reviews.* **111** (10):6491-6512.

Bjorkhem I. and S. Meaney,(2004). 'Brain cholesterol: Long secret life behind a barrier'. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology.* **24** (5):806-815.

Björkhem I., T. Miettinen, E. Reihner, S. Ewerth, B. Angelin, and K. Einarsson,(1987). 'Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG-CoA reductase in human liver'. *Journal of Lipid Research.* **28** (10):1137-1143.

Blanc M., W.Y. Hsieh, K.A. Robertson, K.A. Kropp, T. Forster, G. Shui, P. Lacaze, S. Watterson, S.J. Griffiths, N.J. Spann, A. Meljon, S. Talbot, K. Krishnan, D.F. Covey, M.R. Wenk, M. Craigon, Z. Ruzsics, J. Haas, A. Angulo, W.J. Griffiths, C.K. Glass, Y. Wang, and P. Ghazal,(2013). 'The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-

hydroxycholesterol to the interferon antiviral response'. *Immunity*. **38** (1):106-118.

Bligh E.G. and W.J. Dyer,(1959). 'A rapid method of total lipid extracion and purification'. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **37** (8):911-917.

Boix E. and A.M. Picó,(2005). 'Inhibidores de la absorción del colesterol'. *Endocrinología y nutrición*. **52** (06):297-308.

Boos K.S. and C.H. Grimm,(1999). 'High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings'. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. **18** (3):175-180.

Boos K.S. and A. Rudolphi,(1997). 'The use of restricted-access media in HPLC .1. Classification and review'. *Lc Gc-Magazine of Separation Science*. **15** (7):602-&.

Breuer O. and I. Bjorkhem,(1995). 'Use of an O-18(2) inhalation technique and mass isotopomwe distribution analysis to study oxygenation of cholesterol in rat. Evidence for in-vivo formation of 7-oxocholesterol, 7-beta-hydroxycholesterol, 24-hydroxycholesterol y 25-hydroxycholesterol'. *Journal of Biological Chemistry*. **270** (35):20278-20284.

Brown A.J., R.T. Dean, and W. Jessup,(1996). 'Free and esterified oxysterol: Formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophages'. *Journal of Lipid Research*. **37** (2):320-335.

Brown A.J. and W. Jessup, *Oxysterols and atherosclerosis*, in *Atherosclerosis*1999. p. 1-28.

Brzozowski A.M., U. Derewenda, Z.S. Derewenda, G.G. Dodson, D.M. Lawson, J.P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hugejensen, S.A. Patkar, and L. Thim,(1991). 'A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex'. *Nature*. **351** (6326):491-494.

Burkard I., K.M. Rentsch, and A. Von Eckardstein,(2004). 'Determination of 24S-and 27-hydroxycholesterol in plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry'. *Journal of Lipid Research*. **45** (4):776-781.

Busch T.P. and A.J. King,(2009). 'Artifact generation and monitoring in analysis of cholesterol oxide products'. *Analytical Biochemistry*. **388** (1):1-14.

Colhoun H.M., J.D. Otvos, M.B. Rubens, M.R. Taskinen, S.R. Underwood, and J.H. Fuller,(2002). 'Lipoprotein Subclasses and Particle Sizes and Their Relationship With Coronary Artery Calcification in Men and Women With and Without Type 1 Diabetes'. *Diabetes*. **51** (6):1949-1956.

Cook S.E. and T.C. Pinkerton,(1986). 'Characterization of internal surface reversed-phase silica supports for liquid-chromatograph'. *Journal of Chromatography*. **368** (2):233-248.

Cui Y.L., J.L. Zhang, Q.C. Zheng, R.J. Niu, Y. Xu, H.X. Zhang, and C.C. Sun,(2013). 'Structural and Dynamic Basis of Human Cytochrome P4507B1: A Survey of Substrate Selectivity and Major Active Site Access Channels'. *Chemistry-a European Journal*. **19** (2):548-556.

Christie,(1993). 'Preparation of lipid extracts from tissues'. *Advances in Lipid Methodology*. 195-213.

De Castro M.D.L., F. Priego-Capote, and A. Peralbo-Molina,(2011). 'The role of ultrasound in analytical derivatizations'. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **879** (17-18):1189-1195.

De Sousa C.S. and M. Korn,(2001). 'Effects of ultrasonic irradiation on the spectrophotometric determination of nickel with dimethylglyoxime'. *Analytica Chimica Acta*. **444** (2):309-315.

Debarber A.E., D. Lutjohann, L. Merkens, and R.D. Steiner,(2008). 'Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of plasma 24S-hydroxycholesterol with chromatographic separation of 25-hydroxycholesterol'. *Analytical Biochemistry*. **381** (1):151-153.

Desilets C.P., M.A. Rounds, and F.E. Regnier,(1991). 'Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid-chromatography'. *Journal of Chromatography*. **544** (1-2):25-39.

Devlin T.M., *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*,Wiley.2002.9780471411369.

Ding J.M. and U.D. Neue,(1999). 'A new approach to the effective preparation of plasma samples for rapid drug quantitation using on-line solid phase extraction mass spectrometry'. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **13** (21):2151-2159.

Domeño C., B. Ruiz, and C. Nerin,(2005). 'Determination of sterols in biological samples by SPME with on-fiber derivatization and GC/FID'. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **381** (8):1576-1583.

Dzeletovic S., O. Breuer, E. Lund, and U. Diczfalusy,(1995). 'Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry'. *Analytical Biochemistry*. **225** (1):73-80.

Echarri I., C. Nerin, D.E. Wells, C. Domeño, and J. Cacho,(1998). 'Multivariate analysis applied to the study of the distribution of chlorobiphenyls (CBs), including the non-ortho-CBs, in fish and sea mammals'. *Analyst*. **123** (3):421-427.

Fiamegos Y.C., C.G. Nanos, and C.D. Stalikas,(2004). 'Ultrasonic-assisted derivatization reaction of amino acids prior to their determination in urine by using single-drop microextraction in conjunction with gas chromatography'. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **813** (1-2):89-94.

Fiehn O.,(2002). 'Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes'. *Plant Molecular Biology*. **48** (1-2):155-171.

Folch J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley,(1957). 'A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues'. *J Biol Chem*. **226** (1):497-509.

Folch J., M. Lees, and G.H.S. Stanley,(1957). 'A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues'. *Journal of Biological Chemistry*. **226** (1):497-509.

Fransson B. and U. Ragnarsson,(1998). 'Separation of enantiomers of alpha-hydroxy acids by reversed-phase liquid chromatography after derivatization with 1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate'. *Journal of Chromatography A*. **827** (1):31-36.

Gallagher R.T., M.P. Balogh, P. Davey, M.R. Jackson, I. Sinclair, and L.J. Southern,(2003). 'Combined electrospray ionization-atmospheric pressure chemical ionization source for use in high-throughput LC-MS applications'. *Analytical Chemistry*. **75** (4):973-977.

Georgi K. and K.S. Boos,(2006). 'Multidimensional on-line SPE for undisturbed LC-MS-MS analysis of basic drugs in biofluids'. *Chromatographia*. **63** (11-12):523-531.

Gold E.S., S.A. Ramsey, M.J. Sartain, J. Selinummi, I. Podolsky, D.J. Rodriguez, R.L. Moritz, and A. Aderem,(2012). 'ATF3 protects against atherosclerosis by suppressing 25-hydroxycholesterol-induced lipid body formation'. *J Exp Med*. **209** (4):807-817.

Gomez-Lechon M.J., M.T. Donato, J.V. Castell, and R. Jover,(2003). 'Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism'. *Current Drug Metabolism*. **4** (4):292-312.

Gylling H. and T.A. Miettinen,(1992). 'Noncholesterol sterols, absorption and synthesis of cholesterol an apolipoprotein-A-I kinetics in a finnish lecithin-cholesterolacyltransferase deficient family'. *Atherosclerosis*. **95** (1):25-33.

Halperin G., M. Elisaf, E. Leitersdorf, and D. Harats,(2000). 'A new method for determination of serum cholestanol by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection'. *Journal of Chromatography B*. **742** (2):345-352.

Hamilton R.L., M.C. Williams, C.J. Fielding, and R.J. Havel,(1976). 'Discolidal bilayer structure of nascent high-density lipoproteins from perfused rat-liver'. *Journal of Clinical Investigation*. **58** (3):667-680.

Helmschrodt C., S. Becker, J. Schröter, M. Hecht, G. Aust, J. Thiery, and U. Ceglarek,(2013). 'Fast LC-MS/MS analysis of free oxysterols derived from reactive oxygen species in human plasma and carotid plaque'. *Clinica Chimica Acta*. **425** (0):3-8.

Herman J.L.,(2002). 'Generic method for on-line extraction of drug substances in the presence of biological matrices using turbulent flow chromatography'. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **16** (5):421-426.

Hermansson J. and A. Grahn,(1994). 'Determination of drugs by direct-injection of plasma into a biocompatible extraction column based on a protein-entrapped hydrophobic phase'. *Journal of Chromatography A*. **660** (1-2):119-129.

Ho T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen,(2002). 'Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions'. *Analyst*. **127** (5):608-613.

Holmes E., J.K. Nicholson, A.W. Nicholls, J.C. Lindon, S.C. Connor, S. Polley, and J. Connelly,(1998). 'The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine'. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **44** (1-2):245-255.

Holtfrerich A., W. Hanekamp, and M. Lehr,(2013). '(4-Phenoxyphenyl)tetrazolecarboxamides and related compounds as dual inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL)'. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **63** 64-75.

Honda A., T. Miyazaki, T. Ikegami, J. Iwamoto, K. Yamashita, M. Numazawa, and Y. Matsuzaki,(2010). 'Highly sensitive and specific analysis of sterol profiles in biological samples by HPLC-ESI-MS/MS'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **121** (3-5):556-564.

Honda A., K. Yamashita, H. Miyazaki, M. Shirai, T. Ikegami, G.R. Xu, M. Numazawa, T. Hara, and Y. Matsuzaki,(2008). 'Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS'. *Journal of Lipid Research*. **49** (9):2063-2073.

Honda A., K. Yamashita, M. Numazawa, T. Ikegami, M. Doy, Y. Matsuzaki, and H. Miyazaki,(2007). 'Highly sensitive quantification of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in human serum by LC-ESI-MS/MS'. *Journal of Lipid Research*. **48** (2):458-464.

Honda A., T. Yoshida, G.R. Xu, Y. Matsuzaki, S. Fukushima, N. Tanaka, M. Doy, S. Shefer, and G. Salen,(2004). 'Significance of plasma 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one and 27-hydroxycholesterol concentrations as markers for hepatic bile acid synthesis in cholesterol-fed rabbits'. *Metabolism-Clinical and Experimental*. **53** (1):42-48.

Hosoya K., Y. Kishii, K. Kimata, T. Araki, and N. Tanaka,(1994). 'Efficiency of porous hydrophilic polymer-based packing materials in chromatographic analysis of drugs existing with polypeptide'. *Chromatographia*. **38** (3-4):177-182.

Ismail O.A., M.S. Halquist, M.Y. Elmamly, A. Shalaby, and H.T. Karnes,(2008). 'Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations'. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **875** (2):333-343.

Ismail O.A., T. Zhang, R.G. Jenkins, and H.T. Karnes,(2010). 'Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry'. *Journal of Chromatography B*. **878** (31):3303-3316.

Jolliffe I., Principal Component Analysis, in *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science*2005, John Wiley & Sons, Ltd.

Jove M., J.M. Moreno-Navarrete, R. Pamplona, W. Ricart, M. Portero-Otin, and J. Manuel Fernandez-Real,(2013). 'Human omental and subcutaneous adipose tissue exhibit specific lipidomic signatures'. *The Faseb Journal*. **21** 21.

Kempen H.J.M., J.F.C. Glatz, J.a.G. Leuven, H.A. Vandervoort, and M.B. Katan,(1988). 'Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol-synthesis in humans'. *Journal of Lipid Research*. **29** (9):1149-1155.

Kihira K., A. Kubota, and T. Hoshita,(1984). 'Absolute configuration at carbon 23 of 5 beta-cholestane-3 alpha,7 alpha,12 alpha,23,25-pentol excreted by patients with cerebrotendinous xanthomatosis'. *Journal of Lipid Research*. **25** (8):871-875.

King M.W., *Integrative Medical Biochemistry: Examination and Board Review*,McGraw-Hill Education.2014.9780071832755.

Korn M., P.M. Primo, and C.S. De Sousa,(2002). 'Influence of ultrasonic waves on phosphate determination by the molybdenum blue method'. *Microchemical Journal*. **73** (3):273-277.

Kornel N., A. Jakab, P. Ferenc, D. Bongiorno, L. Ceraulo, M.R. Averna, D. Noto, and V. Karoly,(2006). 'Analysis of sterols by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry combined with chemometrics'. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **20** (16):2433-2440.

Kudo K., G.T. Emmons, E.W. Casserly, D.P. Via, L.C. Smith, J.S. Pyrek, and G.J. Schroepfer,(1989). 'Inhibitors of sterol synthesis-Chromatography of acetate derivatives of oxygenated sterols'. *Journal of Lipid Research*. **30** (7):1097-1111.

Kuksis A.,(2001). 'Plasma non-cholesterol sterols'. *Journal of Chromatography A*. **935** (1-2):203-236.

Lawrence P. and J.T. Brenna,(2006). 'Acetonitrile covalent adduct chemical ionization mass spectrometry for double bond localization in non-methylene-interrupted polyene fatty acid methyl esters'. *Analytical Chemistry*. **78** (4):1312-1317.

Lee R.G., M.C. Willingham, M.A. Davis, K.A. Skinner, and L.L. Rudel,(2000). 'Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates'. *Journal of Lipid Research*. **41** (12):1991-2001.

Lembcke J., U. Ceglarek, G.M. Fiedler, S. Baumann, A. Leichtle, and J. Thiery,(2005). 'Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS'. *Journal of Lipid Research*. **46** (1):21-26.

Li-Hawkins J., E.G. Lund, S.D. Turley, and D.W. Russell,(2000). 'Disruption of the oxysterol 7 alpha-hydroxylase gene in mice'. *Journal of Biological Chemistry*. **275** (22):16536-16542.

Lin D.S., R.D. Steiner, L.S. Merkens, A.S. Pappu, and W.E. Connor,(2010). 'The effects of sterol structure upon sterol esterification'. *Atherosclerosis*. **208** (1):155-160.

Lövgren-Sandblom A., M. Heverin, H. Larsson, E. Lundström, J. Wahren, U. Diczfalusy, and I. Björkhem,(2007). 'Novel LC-MS/MS method for assay of 7[alpha]-hydroxy-4-cholesten-3-one in human plasma: Evidence for a significant extrahepatic metabolism'. *Journal of Chromatography B*. **856** (1-2):15-19.

Lund E., J. Olund, and I. Bjorkhem,(1990). 'Determination of serum levels of unesterified lanosterol by isotope-dilution mass-spectrometry'. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. **50** (7):723-728.

Lutjohann D., O. Breuer, G. Ahlborg, I. Nennesmo, A. Siden, U. Diczfalusy, and I. Bjorkhem,(1996). 'Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93** (18):9799-9804.

Martinez-Beamonte R., M.A. Navarro, S. Acin, N. Guillen, C. Barranquero, C. Arnal, J. Surra, and J. Osada,(2013). 'Postprandial Changes in High Density Lipoproteins in Rats Subjected to Gavage Administration of Virgin Olive Oil'. *Plos One*. **8** (1).

Mason T.J. and D. Peters, *Practical Sonochemistry: Uses and Applications of Ultrasound*, Horwood.2002.9781898563839.

Matyash V., G. Liebisch, T.V. Kurzchalia, A. Shevchenko, and D. Schwudke,(2008). 'Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics'. *Journal of Lipid Research*. **49** (5):1137-1146.

Mcdonald J.G., C.L. Cummins, R.M. Barkley, B.M. Thompson, and H.A. Lincoln,(2008). 'Identification and quantitation of sorbitol-based nuclear clarifying agents extracted from common laboratory and consumer plasticware made of polypropylene'. *Analytical Chemistry*. **80** (14):5532-5541.

Mcdonald J.G., D.D. Smith, A.R. Stiles, and D.W. Russell,(2012). 'A comprehensive method for extraction and quantitative analysis of sterols and secosteroids from human plasma'. *Journal of Lipid Research*. **53** (7):1399-1409.

Mcdonald J.G., B.M. Thompson, E.C. Mccrum, and D.W. Russell, Extraction and Analysis of Sterols in Biological Matrices by High Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry, in *Methods in Enzymology*, H.A. Brown, Editor 2007, Academic Press. p. 145-170.

Mclafferty F.W. and F. Turecek, *Interpretation of Mass Spectra*,4,Sausalito (California):1993.0-935702-25-3.

Mendiara I., C. Domeño, and C. Nerin,(2012). 'Development of a fast sample treatment for the analysis of free and bonded sterols in human serum by LC-MS'. *Journal of Separation Science*. **35** (23):3308-3316.

Miettinen T.A. and H. Gylling,(2003). 'Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment'. *European Journal of Clinical Investigation*. **33** (11):976-982.

Miettinen T.A., H. Gylling, and M.J. Nissinen,(2011). 'The role of serum non-cholesterol sterols as surrogate markers of absolute cholesterol synthesis and absorption'. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. **21** (10):765-769.

Miettinen T.A., R.S. Tilvis, and Y.A. Kesaniemi,(1990). 'Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male-population'. *American Journal of Epidemiology*. **131** (1):20-31.

Miller N.J., *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*,Ed. 4,Madrid:Prentice Hall.2002.ISBN 978-84-205-3514-2.

Mizuguchi H., N. Kudo, and Y. Kawashima,(2001). 'Metabolic alterations by clofibrac acid in the formation of molecular species of phosphatidylcholine in rat liver'. *Biochemical Pharmacology*. **62** (7):853-861.

Molina M.T., C.M. Vazquez, and V.R. Gutierrez,(1991). 'Cholesterol metabolism: Its regulation at the hepatic and intestinal level'. *Grasas Y Aceites*. **42** (4):298-308.

Mullett W.M. and J. Pawliszyn,(2001). 'Direct and LC analysis of five benzodiazepines in human urine plasma using an ADS restricted access extraction column'. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **26** (5-6):899-908.

Nelson G.J.,(1993). 'Isolation and purification of lipids from biological matrices'. *Analyses of Fats, Oils, and Lipoproteins*. 20-59.

Nes W.D.,(2011). 'Biosynthesis of cholesterol and other sterols'. *Chem Rev*. **111** (10):6423-6451.

Nguyen H.P., L. Li, I.S. Nethrapalli, N.N. Guo, C.D. Toran-Allerand, D.E. Harrison, C.M. Astle, and K.A. Schug,(2011). 'Evaluation of matrix effects in analysis of estrogen using liquid chromatography-tandem mass spectrometry'. *Journal of Separation Science*. **34** (15):1781-1787.

Nicholson J.K., J.C. Lindon, and E. Holmes,(1999). "Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data'. *Xenobiotica*. **29** (11):1181-1189.

Nikkila K., K. Hockerstedt, and T.A. Miettinen,(1992). 'Serum and hepatic cholestanol, squalene and noncholesterol sterols in man-A study on liver transplantaion'. *Hepatology*. **15** (5):863-870.

Norlin M. and J.Y.L. Chiang,(2004). 'Transcriptional regulation of human oxysterol 7 alpha-hydroxylase by sterol response element binding protein'. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **316** (1):158-164.

Orozco-Solano M., J. Ruiz-Jimenez, and M.D.L. De Castro,(2010). 'Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry'. *Journal of Chromatography A*. **1217** (8):1227-1235.

Ortega L., R. López, J. Cacho, and V. Ferreira,(2001). 'Use of solid-liquid distribution coefficients to determine retention properties of Porapak-Q resins: Determination of optimal conditions to isolate alkyl-methoxypyrazines and beta-damascenone from wine'. *Journal of Chromatography A*. **931** (1-2):31-39.

Park P.W., F. Guardiola, S.H. Park, and P.B. Addis,(1996). 'Kinetic evaluation of 3 β -hydroxycholest-5-en-7-one (7-ketocholesterol) stability during saponification'. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73** 623-629.

Pass G.J., W. Becker, R. Kluge, K. Linnartz, L. Plum, K. Giesen, and H.G. Joost,(2002). 'Effect of hyperinsulinemia and type 2 diabetes-like hyperglycemia on expression of hepatic cytochrome P450 and glutathione S-transferase isoforms in a New Zealand obese-derived mouse backcross population'. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **302** (2):442-450.

Pedersen-Bjergaard S. and K.E. Rasmussen,(2005). 'Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques'. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **817** (1):3-12.

Phillips K.M., D.M. Ruggio, and J.A. Bailey,(1999). 'Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography'. *Journal of Chromatography B*. **732** (1):17-29.

Pikuleva I.A. and M.R. Waterman,(2013). 'Cytochromes P450: Roles in Diseases'. *Journal of Biological Chemistry*. **288** (24):17091-17098.

Pocoví M. and C. Gómez-Moreno, *El colesterol: una molécula entre la vida y la muerte : discurso de ingreso leído por el académico electo Ilmo. Sr. D. Miguel Pocoví Mieras y discurso de contestación por el Ilmo. Sr. D. Carlos Gómez-Moreno Calera, académico numerario*, 2004, Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza: Zaragoza.

Poole C.F., A.D. Gunatilleka, and R. Sethuraman,(2000). 'Contributions of theory to method development in solid-phase extraction'. *Journal of Chromatography A*. **885** (1-2):17-39.

Pucci V., S. Di Palma, A. Alfieri, F. Bonelli, and E. Monteagudo,(2009). 'A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC-ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE'. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **50** (5):867-871.

Rada M., V. Ruiz-Gutierrez, and A. Guinda,(2011). 'Determination of Triterpenic Acids in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography: Triterpenoid Interaction with Serum Protein'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59** (6):2308-2313.

Rambla-Alegre M., J. Esteve-Romero, and S. Carda-Broch,(2012). 'Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question'. *Journal of Chromatography A*. **1232** (0):101-109.

Reboldi A., E.V. Dang, J.G. McDonald, G. Liang, D.W. Russell, and J.G. Cyster,(2014). 'Inflammation 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon'. *Science*. **345** (6197):679-684.

Robins S.J. and J.M. Fasulo,(1999). 'Delineation of a novel hepatic route for the selective transfer of unesterified sterols from high-density lipoproteins to bile: Studies using the perfused rat liver'. *Hepatology*. **29** (5):1541-1548.

Roldan E.R.S., R. Martinezdalmay, and F. Mollinedo,(1994). 'Diacylglycerol and alkylacylglycerol stimulate ram sperm phospholipase A(2)'. *International Journal of Biochemistry*. **26** (7):951-958.

Ros E.,(2000). 'Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk'. *Atherosclerosis*. **151** (2):357-379.

Ros E.,(2006). 'Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática'. *Revista Española de Cardiología*. **6** (Supl.G):52-62.

Rose K., A. Allan, S. Gauldie, G. Stapleton, L. Dobbie, X. Dott, C. Martin, L. Wang, E. Hedlund, J.R. Seckl, J.A. Gustafsson, and R. Lathe,(2001). 'Neurosteroid hydroxylase CYP7B - Vivid reporter activity in dentate gyrus of gene-targeted mice and abolition of a widespread pathway of steroid and oxysterol hydroxylation'. *Journal of Biological Chemistry*. **276** (26):23937-23944.

Rossmann B., K. Thurner, and W. Luf,(2007). 'MS-MS fragmentation patterns of cholesterol oxidation products'. *Monatshefte Fur Chemie*. **138** (5):436-444.

Rudolphi A. and K.S. Boos,(1997). 'The use of restricted-access media in HPLC .2. Applications'. *Lc Gc-Magazine of Separation Science*. **15** (9):814-&.

Ruiz-Jimenez J. and M.D.L. De Castro,(2003). 'Flow injection manifolds for liquid-liquid extraction without phase separation assisted by ultrasound'. *Analytica Chimica Acta*. **489** (1):1-11.

Ruiz B., A. Farres, E. Langley, F. Masso, and S. Sanchez,(2001). 'Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*'. *Lipids*. **36** (3):283-289.

Russell D.W. and K.D.R. Setchell,(1992). 'Bile-Acid Biosynthesis'. *Biochemistry*. **31** (20):4737-4749.

Salen G. and A. Polito,(1972). 'Biosynthesis of 5 α -Cholestan-3 β -ol in Cerebrotendinous Xanthomatosis'. *The Journal of Clinical Investigation*. **51** (1):134-140.

Sanclemente T., I. Marques-Lopes, J. Puzo, and A.L. Garcia-Otin,(2009). 'Role of naturally-occurring plant sterols on intestinal cholesterol absorption and plasmatic levels'. *Journal of Physiology and Biochemistry*. **65** (1):87-98.

Sánchez-Pérez A., M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, and J. Hernández-Méndez,(2000). 'Automated analysis of vitamin E isomers in vegetable oils by continuous membrane extraction and liquid chromatography–electrochemical detection'. *Journal of Chromatography A*. **881** (1–2):229-241.

Schoenmakers P., P. Marriott, and J. Beens,(2003). 'Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography'. *Lc Gc Europe*. **16** (6):335-339.

Sharpe L.J., V. Burns, and A.J. Brown,(2014). 'A Lipidomic Perspective on Intermediates in Cholesterol Synthesis as Indicators of Disease Status'. *Journal of Genetics and Genomics*. **41** (5):275-282.

Shibata N., A.F. Carlin, N.J. Spann, K. Saijo, C.S. Morello, J.G. McDonald, C.E. Romanoski, M.R. Maurya, M.U. Kaikkonen, M.T. Lam, A. Crotti, D. Reichart, J.N. Fox, O. Quehenberger, C.R. Raetz, M.C. Sullards, R.C. Murphy, A.H. Merrill, Jr., H.A. Brown, E.A. Dennis, E. Fahy, S. Subramaniam, D.R. Cavener, D.H. Spector, D.W. Russell, and C.K. Glass,(2013). '25-Hydroxycholesterol activates the integrated stress response to reprogram transcription and translation in macrophages'. *J Biol Chem*. **288** (50):35812-35823.

Short L.C., K.A. Hanold, S.-S. Cai, and J.A. Syage,(2007). 'Electrospray ionization/atmospheric pressure photoionization multimode source for low-flow liquid chromatography/mass spectrometric analysis'. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **21** (10):1561-1566.

Smiljanic K., T. Vanmierlo, A.M. Djordjevic, M. Perovic, N. Loncarevic-Vasiljkovic, V. Tesic, L. Rakic, S. Ruzdijic, D. Lutjohann, and S. Kanazir,(2013). 'Aging Induces Tissue-Specific Changes in Cholesterol Metabolism in Rat Brain and Liver'. *Lipids*. **48** (11):1069-1077.

Souverain S., S. Rudaz, and J.L. Veuthey,(2004). 'Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis'. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **801** (2):141-156.

Stiles A.R., J.G. McDonald, D.R. Bauman, and D.W. Russell,(2009). 'CYP7B1: One Cytochrome P450, Two Human Genetic Diseases, and Multiple Physiological Functions'. *Journal of Biological Chemistry*. **284** (42):28485-28489.

Swell L. and C.R. Treadwell,(1955). 'Cholesterol esterases.6: Relative specificity and activity of pancreatic cholesterol esterase'. *Journal of Biological Chemistry*. **212** (1):141-150.

Taketani S., T. Nishino, and H. Katsuki,(1981). 'Purification and properties of sterol-ester hydrolase from *saccharomyces-cerevisiae*'. *Journal of Biochemistry*. **89** (6):1667-1673.

Tapp H.S. and E.K. Kemsley,(2009). 'Notes on the practical utility of OPLS'. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **28** (11):1322-1327.

Thompson G.R.,(2004). 'Use of plasma markers as indices of sterol metabolism'. *International Congress Series*. **1262** 603-606.

Trufelli H., P. Palma, G. Famiglioni, and A. Cappiello,(2011). 'An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry'. *Mass Spectrometry Reviews*. **30** (3):491-509.

Trygg J. and S. Wold,(2002). 'Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)'. *Journal of Chemometrics*. **16** (3):119-128.

Umetani M., H. Domoto, A.K. Gormley, I.S. Yuhanna, C.L. Cummins, N.B. Javitt, K.S. Korach, P.W. Shaul, and D.J. Mangelsdorf,(2007). '27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen'. *Nat Med*. **13** (10):1185-1192.

Uomori A., S. Seo, T. Sato, Y. Yoshimura, and K. Takeda,(1987). 'Synthesis of (25R)-26-2H1 cholesterol and H-1-NMR and HPLC resolution of (25R)-26-hydroxycholesterol and (25S)-26 hydroxycholesterol'. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*. (8):1713-1718.

Whiley L., J. Godzien, F.J. Ruperez, C. Legido-Quigley, and C. Barbas,(2012). 'In-Vial Dual Extraction for Direct LC-MS Analysis of Plasma for Comprehensive and Highly Reproducible Metabolic Fingerprinting'. *Analytical Chemistry*. **84** (14):5992-5999.

Whitfield P.D., A.J. German, and P.J.M. Noble,(2004). 'Metabolomics: an emerging post-genomic tool for nutrition'. *British Journal of Nutrition*. **92** (4):549-555.

Wishart D.S., T. Jewison, A.C. Guo, M. Wilson, C. Knox, Y.F. Liu, Y. Djoumbou, R. Mandal, F. Aziat, E. Dong, S. Bouatra, I. Sinelnikov, D. Arndt, J.G. Xia, P. Liu, F. Yallou, T. Bjorndahl, R. Perez-Pineiro, R. Eisner, F. Allen, V. Neveu, R. Greiner, and A. Scalbert,(2013). 'HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013'. *Nucleic Acids Research*. **41** (D1):D801-D807.

Wold S., A. Ruhe, H. Wold, and W.J. Dunn,(1984). 'The collinearity problem in linear-regression-the partial least-squares (PLS) approach to generalized inverses'. *Siam Journal on Scientific and Statistical Computing*. **5** (3):735-743.

Xu Y., Y. Yuan, L. Smith, R. Edom, N. Weng, R. Mamidi, J. Silva, D.C. Evans, and H.-K. Lim,(2013). 'LC-ESI-MS/MS quantification of 4 β -hydroxycholesterol and cholesterol in plasma samples of limited volume'. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **85** (0):145-154.

Xu Z., K. Le, and M.H. Moghadasian,(2008). 'Long-term phytosterol treatment alters gene expression in the liver of apo E-deficient mice'. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **19** (8):545-554.

Zygler A., A. Wasik, and J. Namieśnik,(2010). 'Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents'. *Talanta*. **82** (5):1742-1748.

SECCIÓN VI:
PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

La realización de esta tesis presentada en esta memoria ha dado las siguientes publicaciones científicas:

- ✓ I.Mendiara, C.Domeño, C.Nerín. **Development of a fast sample treatment for the analysis of free and bonded sterols in human serum by liquid chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Separation Science* **35** (2012) 3308. Impact Factor: 2.731
- ✓ I.Mendiara; K.Bentayeb; Nerín C. Domeño C. **Online solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry to determine free sterols in human serum.** *Talanta*. Aceptado: Octubre 2014. Impact Factor: 3.511
- ✓ R. Martínez-Beamonte, N. Guillén, J.C. Surra, M.A. Navarro, S. Sancho, C. Barranquero, C. Arnal, J.J. Puente, I.Mendiara, C. Domeño, C.Nerín, Aron M. Geurts, J. Osada. **Disruption of the**

Cyp7b1 Gene in Rats Blocks the Postprandial Sphingomyelin Cargo of High Density Lipoproteins. *PNAS*. Enviado Octubre 2014. Impact Factor: 9.809

- ✓ I.Mendiara; R. Martínez-Beamonte; C. Domeño; C. Nerín; J. Osada. **Enzymatic hydrolysis for the determination of oxysterols in rat plasma by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry.** *Journal of Lipid Research*. Enviado: Octubre 2014. Impact Factor: 4.386.
- ✓ I.Mendiara; R. Martínez-Beamonte; M. Aznar; C. Domeño; C. Nerín; J. Osada. **Identification of new markers in cholesterol metabolism related diseases in rat liver by UPLC-ESI-MS/Q-TOF.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Enviado: Octubre 2014. Impact Factor: 3.578.

